

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

А. УЛЙТ, Ф. ХЕНДЛЕР, Э. СМИТ,
Р. ХИЛЛ, И. ЛЕМАН

[1]



Principles of Biochemistry

sixth edition

ABRAHAM WHITE, PH. D.

Distinguished Scientist, Syntex Research
Consulting Professor of Biochemistry
Stanford University School of Medicine

PHILIP HANDLER, PH. D.

President, National Academy of Sciences
James B. Duke Professor of Biochemistry
Duke University School of Medicine

EMIL L. SMITH, PH. D.

Professor and Chairman, Department of Biological Chemistry
School of Medicine
University of California, Los Angeles

ROBERT L. HILL, PH. D.

James B. Duke Professor and Chairman,
Department of Biochemistry
Duke University School of Medicine

I. ROBERT LEHMAN, PH. D.

Professor and Chairman, Department of Biochemistry
Stanford University School of Medicine

McGRAW-HILL	BOOK	COMPANY
New York	Madrid	Tokyo
Auckland	Panama	Johannesburg
London	Sydney	Montreal
New Delhi	San Francisco	São Paulo
Singapore	Düsseldorf	Toronto
St. Louis	Mexico	
Bogotá	Paris	

А. УАЙТ, Ф. ХЕНДЛЕР,
Э. СМИТ, Р. ХИЛЛ,
И. ЛЕМАН

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

В трех томах

[1]

Перевод с английского
чл.-корр. АН СССР В. П. Скулачева,
д-ра хим. наук Л. М. Гинодмана
и канд. хим. наук Т. В. Марченко

под редакцией
академика Ю. А. Овчинникова

ИЗДАТЕЛЬСТВО <МИР>
МОСКВА
1981

ББК 28.072

О-75

УДК 571.1

О-75

Авторы: А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, Р. Хилл, И. Леман

Основы биохимии: В 3-х томах. Т. 1. Пер. с англ./Перевод В. П. Скулачева, Л. М. Гиномдмана, Т. В. Марченко; Под ред. и с предисл. Ю. А. Овчинникова.—М.: Мир, 1981.—534 с. с ил.

В книге американских авторов изложены основные представления современной биохимии; она позволяет также получить необходимые представления о смежных разделах биологической науки, в которых успешно используются подходы и методы биохимии.

В том 1 вошли гл. 1—13, которые включают рассмотрение главных компонентов клетки, катализ ферментами и некоторые аспекты метаболизма.

Предназначена для преподавателей, студентов и научных работников, специализирующихся в этой области.

О $\frac{20505-085}{041(01)-81}$ 85-81, ч. 1 2015000000

ББК 28.072

57.04

Редакция литературы по химии

© 1978, 1973, 1968, 1964, 1959 by McGraw-Hill, Inc. All rights reserved

© 1954 by McGraw-Hill, Inc. All rights reserved

© Перевод на русский язык, «Мир», 1981

ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРА ПЕРЕВОДА

Развитие современного естествознания характеризуется стремительным ростом достижений биологической науки. Учение о жизни сегодня блистает фейерверком удивительных явлений и новых открытий, оно революционизирует наше мировоззрение, опережает самые оптимистические прогнозы и оказывает все большее влияние на практическую деятельность человека. Конец двадцатого века знаменует собой не только расцвет биологии теоретической, но и становление прогрессивной, быстро развивающейся отрасли производства — биотехнологии.

Общепризнано, что среди генеральных направлений биологии наиболее мощно набирает сейчас темпы биология физико-химическая, т. е. область изучения живой материи, использующая идеи, методы и подходы химии, физики и математики. На широком фронте физико-химической биологии особенно рельефно вырисовываются достижения молекулярной биологии (и прежде всего ее лидера — молекулярной генетики), различных сфер биофизики и математической биологии, биоорганической химии. Однако у истоков этого «движения» биологии навстречу точным наукам, несомненно, находится биохимия, проделавшая сложный и увлекательный путь от классической до современной. Определяя биохимию как широкое научное направление, следует включить в нее изучение химических основ и механизмов жизнедеятельности, «химию жизни», о каких бы проявлениях жизни ни шла речь; с таких позиций биохимия поистине универсальна. Однако в более конкретном, сегодняшнем звучании биохимия представляет собой область физико-химической биологии, связанную с познанием процессов метаболизма и путей их регуляции и энергетического обеспечения. Поэтому вполне естественен вывод о том, что биохимия — это тот фундамент, на котором зиждется наше представление о живой природе, о ее поразительной целесообразности и об единстве управляющих ею законов, это тот материалистический принцип, который помогает нам понять смысл, могущество и красоту явлений, составляющих в совокупности самое великое на земле — жизнь.

Книга А. Уайта и др. «Основы биохимии» принадлежит к числу монументальных трудов; в ней изложена сущность современной биохимической науки в ее широком понимании и демонстрируются новейшие достижения и перспективы этой области знания. Написанная крупнейшими биохимиками, внесшими существенный вклад в развитие ряда направлений биохимии, эта книга удачно отобразила широкое полотно событий и фактов, определяющих прогресс биохимии за последние десятилетия; изложение материала книги сделано с четких позиций, с учетом объективного хода событий и субъективных, личных оценок авторов. Авторы не ставят себе целью энциклопедически точно воспроизвести все известные факты, а скорее стремятся дать единое толкование биохимических функций и механизмов в непосредственной связи с химической структурой участвующих компонентов и систем. Книга напоминает собой рассказ, глубокий и профессиональный, но в то же время увлекательный и эмоциональный, о мире современной биохимии, где рассказчик не пренебрегает азбукой живой материи и не боится увести слушателя в лабиринт сложных, еще не решенных проблем. Главное достоинство «Основ биохимии» — обсуждение наиболее актуальных вопросов биохимической науки наших дней, кардинальных аспектов ее развития, выполненное с большим мастерством и компетентностью, в тесной связи с данными смежных научных дисциплин.

Книга А. Уайта и др. «Основы биохимии» изложена доступно и порой даже популярно. Положения и выводы книги хорошо иллюстрируются экспериментальными данными и примерами, к сожалению, взятыми в основном из работ американских исследователей. Следует отметить как достоинство книги ее выразительный и лаконичный язык.

Перевод книги выполнен известными специалистами — видным советским биохимиком чл.-корр. АН СССР В. П. Скулачевым, докторами хим. наук Э. И. Будовским и Л. М. Гинодманом, а также канд. хим. наук Т. В. Марченко.

Книга, несомненно, окажется полезной ученым-биохимикам, преподавателям вузов, аспирантам и студентам — всем тем, кто интересуется физико-химическими основами процессов жизнедеятельности. Много ценного сумеют в ней почерпнуть и специалисты в области медицины и сельскохозяйственной науки, работники микробиологической промышленности и других смежных отраслей производства, использующие подходы и методы современной биохимии. Представляемая читателю книга будет способствовать развитию и распространению в нашей стране биохимических знаний.

Ю. Овчинников

ПРЕДИСЛОВИЕ

Подготовка первого издания этой книги была начата более 25 лет назад. Даже беглое сравнение настоящего издания с первым с полной очевидностью показывает, как необычайно усложнились и углубились биохимические представления за прошедшее время. Бурный рост биохимии не только привел к огромному увеличению объема сведений о традиционных объектах биохимического исследования, но побудил к рассмотрению биохимической природы многочисленных биологических структур и процессов. Разнообразие тем, затронутых в первой, вводной главе «Предмет биохимии», показывает, что биохимические понятия стали общепринятыми во многих разделах биологии.

Ретроспективно оценивая характер накопления знаний, можно отметить, что он подчинялся определенной логике: вначале были исследованы простейшие, наиболее общие закономерности, затем анализу подвергались по возможности все более сложные, требующие детального рассмотрения явления. Границы, отделяющие биохимию от большинства других разделов биологии, если они вообще сейчас имеются, стали чисто условными. Биохимия легла в основу клеточной биологии, иммунологии, микробиологии, физиологии, фармакологии, патологии и генетики и стала средством выражения понятий в этих разделах науки; ее язык используется также при описании явлений и закономерностей экологии, клинической медицины и сельского хозяйства.

Целью данного издания по-прежнему остается изложение основных понятий биохимии; разделы, включенные в книгу, представляют собой главным образом общий интерес; особое внимание уделено биохимическим проблемам в организмах млекопитающих, и прежде всего человека. Вместе с тем, как и в предыдущих изданиях, достаточно подробно рассмотрены разные аспекты биохимии организмов, принадлежащих к другим классам и типам. Во многих случаях это обусловлено тем, что фундаментальные процессы, которые характерны для всех живых существ, можно более глубоко исследовать на простых организмах. Некоторые процессы, такие, как синтез определенных аминокислот и фотосинтез углеводов,

не происходят в организме млекопитающих, однако имеют настолько важное значение для биологии в целом, что им посвящены специальные главы. Читатели-медики, вероятно, могут пропустить такие разделы; однако изучение этого материала несомненно принесет пользу тем, кто интересуется более общими проблемами биохимии.

Рассмотрение некоторых особенно обширных проблем (например, биологическое окисление, обмен углеводов и аминокислот, биохимия крови) занимает несколько глав. Благодаря этому читатель имеет возможность выбрать в соответствии с кругом своих научных интересов главы, которые подробно освещают те или иные специальные вопросы биохимии. Мы отдаем себе отчет в том, что не всякий курс биохимии может полностью включать все те темы, которые обсуждаются в нашей книге. Увеличение объема биохимии привело к необходимости строить изложение таким образом, чтобы оно удовлетворяло читателей с весьма различными профессиональными и научными интересами. Очевидно также, что не все предлагаемые здесь темы смогут получить отражение в вводном курсе биохимии. Однако мы надеемся, что в ходе дальнейшего обучения студенты расширят и углубят свои знания. Например, первоначально студенту достаточно усвоить материал по биологическому окислению, изложенный в гл. 12; гл. 13, включающая более специальные вопросы, полезна для углубленного изучения и для справок.

Некоторые биохимические процессы протекают не совсем одинаково у млекопитающих и у организмов, относящихся к другим группам. Соответствующие сопоставления делаются только в тех случаях, когда это необходимо для лучшего понимания метаболизма млекопитающих. Иногда, чтобы не нарушать ход изложения основных вопросов, материал такого характера набран петитом. Приведено также весьма немного примеров патологических нарушений нормальных процессов, которые представляют собой по сути эксперименты, поставленные самой природой; изучение их помогает лучшему пониманию естественного процесса.

Бурный рост биохимических знаний и исчезновение границ между биохимией и другими биологическими науками вызвали необходимость серьезно переработать предыдущее издание с целью подготовки современного руководства. Поэтому очень доброжелательно было встречено включение в авторский коллектив двух новых членов, что значительно облегчило уже саму задачу составления плана шестого издания, а также, что было очень важным, позволило изменить структуру нескольких глав и характер изложения в них материала. Как и в ранних изданиях, каждый автор знакомился со всей книгой, просматривал все главы, принимал участие в обсуждении и переработке материала, и, следовательно, по-прежнему несет ответственность за содержание всей книги.

Стремительное развитие биохимии привело к пониманию молекулярных механизмов ряда биологических явлений, включая такие проблемы, как структура белков, механизм ферментативного катализа, различные аспекты процессов синтеза нуклеиновых кислот и белков (в том числе генетическое значение и роль изменений этих процессов в патологии), особенности регуляции метаболизма, строение и роль различных клеточных органелл и мембран, биоэнергетика, основы мышечного сокращения, структура и функция нервной системы и соединительной ткани, механизм действия гормонов. Это заставило фактически заново написать более 75% книги. Даже те из глав, которые в основном были сохранены в соответствии с предыдущим изданием, были значительно переработаны. Содержание четырех совершенно новых глав — «Простагландины», «Вирусы», «Иммунохимия и система комплемента» и «Тимус» — отражает увеличивающийся вклад фундаментальных представлений и экспериментальных подходов биохимии в развитие других разделов биологии.

Нам пришлось преодолеть серьезные трудности, связанные с изложением в сжатой форме все возрастающего объема биохимической информации, а также с выбором разделов, которые следует считать наиболее важными. Мы были вынуждены, к сожалению, опустить большую часть сведений по истории биохимии и свести к минимуму экспериментальные обоснования излагаемого материала. Мы надеемся, однако, что приведенное краткое описание различных типов экспериментов и сделанные замечания о их использовании в научных исследованиях позволят студенту получить представление о путях получения биохимической информации. К большому нашему сожалению пришлось отказаться от возможности указывать имена многих сотен ученых, труды которых обеспечили бурный расцвет биохимии.

Мы выражаем глубокую признательность многочисленным коллегам и друзьям за информацию и критические замечания, учтенные при подготовке этого нового издания, а также тем преподавателям и студентам, которые дали ряд ценных советов и обратили наше внимание на случайные ошибки. Мы хотим также поблагодарить издателей Д. Д. Джефферса и А. Макноу, а также М. Лабарбера и Т. Армстронга за терпение и благожелательность, помощь и сотрудничество, а также координацию всей деятельности, связанной с завершением публикации этой книги.

И, наконец, мы глубоко благодарны нашим женам за терпение и моральную поддержку в течение долгих дней, потребовавшихся для подготовки и завершения настоящего издания.

А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, Р. Хилл, И. Леман

Глава 1

ПРЕДМЕТ БИОХИМИИ

В древнем языке слово *жизнь* употреблялось применительно к таким разным объектам, как трава, деревья, насекомые, черви, птицы, рыбы и человек. Все они проходят жизненный цикл, воспроизводят себе подобных и отвечают определенным образом на сигналы, поступающие из внешней среды. В течение нескольких тысячелетий была создана классификация «живых» форм, первоначально на основе признаков, видимых невооруженным глазом, т. е. их сравнительной макроанатомии, и позже с помощью светового микроскопа. В начале XIX в. Шлейден и Шванн обнаружили, что все живые организмы построены из отдельных клеток, довольно сходных по размерам и общему строению. На основании этой еще весьма скудной информации и глубокого анализа данных палеонтологии Дарвин сумел сформулировать самое всеобъемлющее и убедительное обобщение в биологии — концепцию непрерывной биологической эволюции.

Между тем развитие естественных наук позволяло биологам решать все более сложные вопросы. Вскоре после определения газового состава атмосферы было установлено, что животные поглощают кислород и выделяют углекислый газ, а зеленые растения осуществляют обратный процесс в ходе фотосинтеза. Лавуазье и Лаплас в 1785 г. показали, что основные законы сохранения энергии и вещества, применимые к физическому миру, также справедливы и для биологических объектов, которые были подвергнуты исследованию. Выделение все новых и новых индивидуальных веществ из живых организмов и установление факта, что все они содержат углерод, явилось началом *органической химии*. Это укрепляло виталистическую точку зрения, однако в 1828 г. Вёлер синтезировал мочевину и показал тем самым, что соединения углерода могут быть получены и без участия живых организмов. После того как Берцелиус сформулировал основные принципы катализа, стало ясно, что пepsин слюны, пepsин желудочного сока и амилаза солода являются биологическими катализаторами. В то время считали, что дрожжи — это простой катализатор, и поэтому ран-

ние исследования химии брожения не способствовали доказательству ложности виталистических представлений. Действительно, по иронии судьбы химический синтез этанола, осуществленный Хепнелем раньше, чем синтез мочевины, не был использован для обобщающих выводов, поскольку до работ Пастера дрожжи не считались живыми организмами.

До тех пор, пока не были установлены основные законы физики и химии, действующие в неживом мире, невозможно было сформулировать проблемы, затрагивающие более глубокое понимание природы жизни. Эти вопросы, которые мы вкратце рассмотрим, были поставлены только в первой четверти XX в. Между тем успешно развивались неорганическая, органическая и физическая химия, были сформулированы законы термодинамики и оказалось возможным детально исследовать, подчиняются ли живые системы законам физики и химии. Получила признание доктрина эволюции, Грегором Менделем были сформулированы генетические принципы наследственности, непрерывно увеличивалось число соединений, выделенных из живых организмов. Была выявлена связующая роль нервной системы. Клод Бернар показал, что гликоген является запасной формой глюкозы в печени и мышцах; он установил также постоянство *внутренней среды* организма. Была сформулирована теория инфекционной природы болезней и начала систематически развиваться микробиология.

На рубеже столетий Эмиль Фишер выяснил структуру многих углеводов, разработал способы выделения аминокислот из белковых гидролизатов; установив оптические конфигурации углеводов и аминокислот и продемонстрировав специфичность действия ферментов, он положил начало ряду современных биохимических направлений. Введя концепцию «ключа и замка» в ферментативном катализе (гл. 9), Фишер начал изучение взаимосвязи между топографией макромолекул и феноменом жизни. Эти работы Фишера, а также исследования Гардена и Йонга, которые использовали случайное наблюдение братьев Бухнеров, показавших, что бесклеточный дрожжевой экстракт может сбраживать глюкозу с образованием спирта (гл. 14), послужили началом современной биохимии. Термин *биохимия* был введен Карлом Нейбергом в 1903 г.

С тех пор объем информации увеличивался экспоненциально; одновременно новые сведения позволили глубже понять существо биохимических процессов. Основными движущими силами биохимических исследований в то время были пыливость ума и стремление разрешить философские проблемы. Вместе с тем все ускоряющееся развитие биохимических исследований часто определялось не столько стремлением человека познать самого себя, сколько надеждой, что полученные знания могут быть использованы для усовершенствования сельского хозяйства и улучшения, таким образом, питания животных и человека, а также способство-

вать лечению болезней. Эти цели были в значительной степени достигнуты.

Биохимические исследования были направлены на решение ряда главных вопросов, каждый из которых продолжает привлекать внимание ученых и в настоящее время. Эти вопросы кратко рассмотрены ниже.

Из каких химических соединений состоят живые существа? Перечень таких соединений является *sine qua non* для понимания химических основ жизни. Вместе с тем постоянно открываются все новые соединения — как в ходе исследований, направленных на расшифровку последовательностей реакций метаболизма, начинающихся с хорошо известных химических веществ, так и в результате выделения природных соединений, ответственных за определенные физиологические эффекты. Универсальное распространение многих из этих соединений определяет значительное сходство *качественного* состава большинства живых организмов; при этом различия между организмами, а также различия между тканями и органами одного и того же организма являются главным образом *количественными*. Эти количественные различия обычно обуславливают различия в функциях и в относительных скоростях осуществления сходных функций, процессов или реакций.

Как построены макромолекулы, входящие в состав живых организмов? Первые биохимики обнаружили в живых организмах вещества, которые были названы белками, нуклеиновыми кислотами, полисахаридами и сложными липидами. Развитие биохимии в немалой степени зависело от разработки методов выделения и очистки этих соединений. С помощью новых физико-химических методов удалось установить, что их молекулярные массы характеризуются величинами от 10 000 до 100 000 000 и более. В течение долгого времени кажущаяся поистине геркулесовой работа по установлению полной структуры таких молекул представлялась экспериментально вообще неосуществимой. Однако создание ряда новых физических приборов: ультрацентрифуг, электрофоретических аппаратов, регистрирующих спектрофотометров, спектрополяриметров и аминокислотных анализаторов — позволило определить основные структурные характеристики этих молекул. Усовершенствованная техника анализа и, в частности, хроматографические методы сделали возможным разделение сложных смесей веществ и определение их микроколичеств, что является необходимой предпосылкой для установления ковалентных структур «строительных блоков» различных макромолекул. Благодаря развитию рентгеноструктурных методов оказалось возможным построить детальные трехмерные модели многих относительно небольших

белков и нуклеиновых кислот. Быстро развиваются представления о характере сил, в результате действия которых эти молекулы, представляющие собой длинные тонкие нити, сворачиваются в высокоспецифичные компактные образования. Способность этих молекул осуществлять биологические функции полностью определяется их трехмерной структурой.

Изучение структуры таких макромолекул успешно развивается, создавая основу для более глубокого понимания механизма действия ферментов, структурных основ генетических эффектов и тонкого строения живых клеток. Рассмотрение этих проблем составляет главную задачу настоящей книги.

Каким образом ферменты осуществляют свою каталитическую функцию? В XIX в. было установлено, что расщепление белков, крахмала и жиров на их составные части происходит в пищеварительном тракте под действием ферментов. То, что брожение также является результатом ферментативного катализа, было позже показано братьями Бухнер. Двадцатью годами раньше Кюне ввел термин *энзим* (от греч. *en zyme* «в дрожжах») для обозначения неорганизованных «ферментов», чтобы отличать их от бактерий, которых также называли ферментами. Вслед за работами Фишера по специфичности ферментов, Михаэлис и другие исследователи сформулировали элементарные закономерности ферментативного катализа, а Самнер выделил в 1926 г. фермент* уреазу в кристаллическом виде. С тех пор выделены сотни ферментов, каждый из которых является более или менее специфичным в отношении определенной химической реакции; многие получены в кристаллическом состоянии. Доказано, что каждый фермент представляет собой уникальный, индивидуальный белок.

Вопрос о том, каким образом эти белки функционируют как катализаторы, является одним из центральных в биохимии; он в то же время один из самых старых. Вероятно, впервые он был сформулирован в 1800 г., когда Академия Первой французской республики предложила премию (1 кг золота) за удовлетворительный ответ на вопрос: «В чем состоит различие между «ферментами» и веществами, которые они сбраживают?» Премия осталась неприсужденной, но те, кто поставил этот вопрос, с удовольствием присудили бы ее столетие спустя Эмилю Фишеру, который, однако, полагал, что его представления носят самый общий характер. В дальнейшем явления, происходящие в ходе ферментативного катализа, и их обусловленность структурой белка-фермента были весьма детально изучены. Этот увлекательный аспект науки, который во многих отношениях можно считать сердцем биохимии, рассмотрен в части второй.

* В научной литературе на русском языке обычно употребляют термин «фермент», а не «энзим». — *Прим. перев.*

Какие вещества необходимы для удовлетворения потребностей человека и других организмов в пище и какова физиологическая роль этих соединений? Перечень таких веществ приведен в части шестой; вещества, необходимые для человеческого организма, по-видимому, уже полностью известны. Эти сведения вполне достаточны для организации правильного питания человека; причина неполноценности питания большей части населения земного шара заключена не в недостатке необходимых сведений, а в низком уровне производства и непропорциональном распределении пищевых продуктов.

При изучении потребностей бактерий в питательных веществах разработаны эффективные экспериментальные подходы, оказавшие влияние на все аспекты биохимических исследований. Возможность количественной оценки бактериального роста положена в основу некоторых аналитических методов. То обстоятельство, что определенное соединение может являться незаменимым компонентом пищи, так как организм не способен его синтезировать, но нуждается в нем для нормального метаболизма, использовано как для расшифровки метаболических путей, так и для выяснения генетических механизмов.

Какие химические процессы обеспечивают превращение пищевых компонентов в соединения, характерные для клеток данного вида? Еще и сегодня не ослабло внимание к изучению многочисленных реакций метаболизма, находившихся до последнего времени в центре внимания биохимиков. Ежедневно организм человека потребляет довольно значительные количества веществ, представляющих собой лишь небольшую группу органических соединений. В организме растущего ребенка часть из них удерживается в виде соединений, существенно отличающихся от поступивших с пищей. Растения же «поглощают» только воду, минеральные соли и CO_2 , но накапливают удивительный набор различных соединений. Большая часть углерода, входящего в соединения пищи, потребленной ребенком, освобождается с выдыхаемым воздухом, а азот выводится с мочой в виде мочевины. Об удивительно тонкой регуляции обменных процессов наглядно свидетельствует способность взрослого организма сохранять постоянную массу и состав, перерабатывая ежедневно ~ 400 г пищи.

При изучении этих процессов мы не имеем возможности провести обычный анализ реакционной смеси; каким же образом установить пути превращения потребленных пищевых продуктов? Выход был найден с помощью применения радиоактивных изотопов, особенно ^{14}C , и приборов, позволяющих измерять их количества. С помощью этого метода, мощных хроматографических методов, а также благодаря возросшему мастерству при работе с тканевыми препаратами *in vitro* удалось достаточно быстро расшифровать

сложную переплетающуюся сеть метаболических путей. Эта работа продолжается и сейчас, хотя, как это будет видно из третьей части книги, основные процессы метаболизма уже можно считать выясненными.

Каким образом потенциальная энергия, освобождающаяся при окислении веществ, содержащихся в пище, используется для реализации множества процессов, протекающих в живой клетке с потреблением энергии? Среди таких процессов назовем только синтез сотен новых видов молекул, накопление в клетке неорганических ионов и органических соединений (против градиентов концентрации) и осуществление механической работы. Простая аналогия между «сжигающими» пищу животными и тепловыми машинами, сжигающими топливо, оказывается неприемлемой, так как тепловая энергия не может быть использована для полезной работы при постоянной температуре. Выяснение биологического пути решения этой проблемы, заключающегося в сопряжении окисления углеводов и жиров с синтезом одного соединения, аденозинтрифосфата (гл. 10, 12 и 13), и в последующем использовании энергии этого соединения практически для всех эндергонических процессов, является кардинально важным для понимания функционирования живых клеток.

Значительное внимание по праву привлекал важный вопрос — выяснение механизма включения CO_2 в состав углеводов при поглощении энергии света (гл. 16). В последние годы значительно расширились и углубились представления о природе первичных реакций фотосинтеза и последующих превращений, приводящих к накоплению углеводов.

Какова структура живой клетки и каким образом она организована для выполнения характерных для нее химических функций? Общие черты клеточной топографии — наружная мембрана, ядро и многочисленные тельца меньшего размера — были уже давно выявлены с помощью светового микроскопа. Электронная микроскопия позволила получить гораздо более подробную объемную картину тонкой структуры клетки: сеть микроканалов; эндоплазматический ретикулум, который начинается от ядра и проходит через цитоплазму иногда вплоть до поверхности клетки; большие сложные тельца, митохондрии; многочисленные плотные тельца меньших размеров, часто присоединенные к ретикулуму; система микротрубочек, выполняющая различные функции; необычная организация нитей в веретене делящейся клетки и двухслойная структура клеточной мембраны (гл. 11). Выделение концентрированных препаратов каждой из этих субструктур, освобожденных от остальных клеточных компонентов, позволило выявить разделение функций внутри клетки: ядро как место генетического контро-

ля и клеточной дупликации; рибосомы как места белкового синтеза; митохондрии как мембранные структуры, в которых окислительный метаболизм обеспечивает образование аденозинтрифосфата; мембраны эндоплазматического ретикулума как место метаболических превращений некоторых неполярных молекул, таких, как стероиды. В клеточной мембране функционируют векториально организованные механизмы, регулирующие электролитный состав цитоплазмы и обеспечивающие доставку необходимых питательных веществ (гл. 11 и 34). Мембрана обладает многочисленными специализированными рецепторами, которые принимают химические сигналы от других клеток и от внешнего окружения. Внутриклеточные сократительные волокна специфичны для клеток определенного типа; цитоплазма представляет собой раствор сотен индивидуальных ферментов, определенным образом направляющих многочисленные метаболические реакции, благодаря которым питательные вещества превращаются в клеточные компоненты. Сумма всех этих химических процессов и составляет «жизнь» клетки.

Каким образом клетки делятся, производя идентичные дочерние клетки? Что представляет собой химия наследственности? Что такое ген и как он функционирует? В истории науки ни один из ее разделов не развивался так быстро и не возбуждал такого всеобщего интереса, как исследования, направленные на выяснение этих вопросов. Немногие разделы науки имеют более глубокое и существенное значение для нашего будущего. Эти проблемы рассматриваются в гл. 25—28.

Форма, организация и функции клетки, т. е. ее жизнь, определяются ее белковым составом и активностью индивидуальных белков. Отсюда следует, что генетические «инструкции» должны содержать информацию, необходимую для точного синтеза набора белков, характерных для данной клетки. Эта информация закодирована в структуре очень больших молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты. При делении клетки необходимо точное воспроизведение этих молекул с последующим равным распределением информации между дочерними клетками. Эта информация должна быть передана от ядра к белковым фабрикам — рибосомам. Изменения химической структуры дезоксирибонуклеиновой кислоты выявляются в виде мутаций в последующих поколениях. Наибольший вклад в расшифровку механизмов наследственности внесли работы, проведенные на непатогенной кишечной бактерии *Escherichia coli* и на бактериофагах (бактериальных вирусах); последние обладают лишь ограниченным количеством генетической информации, содержащейся в нуклеиновой кислоте, которая окружена специфической белковой оболочкой; они способны к самовоспроизведению только путем использования синтетического аппарата жи-

вой клетки-хозяина. Полученная в этих исследованиях информация позволила понять законы генетики, природу наследственных болезней и биохимические аспекты эволюции.

Если бы концепция эволюции не возникла раньше на основе других наук, она безусловно оказалась бы очевидной для биохимика. Хотя даже невооруженным глазом обнаруживается широкое разнообразие жизненных форм, для *всех* них справедливы качественно одинаковые ответы на поставленные выше вопросы. Впечатляющее единство основных аспектов различных форм жизни сочетается с удивительным разнообразием этих форм, возникающим благодаря небольшим вариациям генетического аппарата.

В живой клетке протекают тысячи различных химических реакций, каждая из которых катализируется специфическим ферментом. Каким же образом достигается их гармоническая синхронизация? Очевидно, что клетке выгодно осуществлять реакции, поставляющие энергию, со скоростями, соответствующими ее энергетическим потребностям, и вырабатывать мономерные единицы (аминокислоты, нуклеотиды, сахара) со скоростями, соответствующими потребностям в этих соединениях для синтеза биополимеров (белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов). Механизмы, благодаря которым осуществляется такая регуляция, стали предметом исследования биохимиков относительно недавно. Хотя некоторые детали остаются невыясненными, удалось установить общие принципы регуляторных механизмов; примеры регуляции скорости ферментативных превращений можно найти в разных разделах этой книги. Сюда относятся механизмы, подобные системам положительной и отрицательной обратной связи в инженерной электронике; они реализуются при функционировании ряда ферментов, участвующих в процессах биосинтеза; при этом обеспечивается постоянный поток, но не избыток необходимых промежуточных продуктов. В других случаях регуляция осуществляется путем репрессии или дерепрессии процесса образования ферментов биосинтеза.

В сложном организме позвоночного животного должна быть обеспечена не только синхронизация различных путей метаболизма каждой клетки, но и согласованная гармоничная работа разных органов — мышц, печени, мозга и др. Например, в случае необходимости информация о метаболическом состоянии мышцы должна быть передана в печень. В большинстве случаев такая взаимосвязь осуществляется с помощью эндокринной системы. Железы внутренней секреции в ответ на изменения химического состава крови, который в свою очередь отражает изменения, происходящие в отдельных тканях или органах, синтезируют и выделяют гормоны, переносимые током крови к органам-мишеням. Там они оказывают влияние на специфические метаболические процессы.

Информация может передаваться и с помощью соединений, которые не являются продуктами эндокринных желез. Нейромедиаторы осуществляют передачу нервного импульса от одной нервной клетки к другой или от нервной клетки к мышечной; простагландины, синтезируемые во многих органах и тканях, модулируют активность различных типов клеток; синтез 1,25-дигидрокси-холекальциферола, активной формы витамина D, ускоряющего всасывание Ca^{2+} слизистой кишечника, осуществляется в результате последовательных реакций, по крайней мере в двух органах. Циклическая адениловая кислота, имеющаяся, по-видимому, во всех живых клетках, образуется из аденозинтрифосфата под действием связанного с мембраной фермента — *аденилатциклазы* — в ответ на поступление сигнала из окружающей клетку среды, например появление пептидного гормона или изменение содержания питательных веществ. Характер вызываемой циклической адениловой кислотой ответной реакции клетки зависит от типа клетки, а также от природы сигнала, вызвавшего синтез эффектора. Рассмотрение регуляторных процессов составляет основное содержание части пятой; об этих процессах часто речь идет и в других разделах.

Каким образом специализированные клетки тканей и органов вносят специфический вклад в функционирование организма животного? Osteoblastы образуют костную ткань, мышечные клетки сокращаются, нервные клетки проводят сигналы, клетки почек участвуют в образовании мочи, клетки эндокринных желез синтезируют гормоны; во всех случаях это осуществляется с помощью механизмов, специфичных для данного типа клеток. Поскольку системы, общие для всех клеток, обычно более доступны для исследования, они изучены биохимиками лучше, чем специфические системы специализированных клеток. В последнее время на основе ранее установленных закономерностей общего характера изучение таких специфических систем развивается весьма успешно. Биохимия специализированных клеток детально рассмотрена в части четвертой, а также в других частях. Дальнейшее развитие исследований в данном направлении является одной из важных задач биохимии.

Каким образом животное регулирует объем и состав жидких сред, окружающих клетки, и крови, обеспечивающей связь между ними? Большой объем информации, накопленной в этой области, оказался чрезвычайно полезным для рационального лечения ряда заболеваний человека и способствовал развитию современной хирургии. Физиологические механизмы регуляции необычайно чувствительны и, подобно хорошим техническим системам, часто обладают необходимым «запасом прочности». Они достигли у чело-

века высокой степени совершенства, позволяя ему жить в разных климатических условиях — от экватора до полюса, спускаться в глубины океана и подниматься на горные вершины; они позволяют человеку выживать в условиях значительных колебаний состава и количества потребляемой пищи и жидкости. Эти регуляторные механизмы рассматриваются в части четвертой.

С регуляцией жизнедеятельности позвоночных тесно связаны физиологические процессы, протекающие в эритроцитах (гл. 32), а также функционирование гемоглобина, который относится к группе наиболее глубоко и обстоятельно изученных белков и служит удобным объектом для выявления взаимосвязи структуры и физиологической функции белка (гл. 31).

Каким образом совокупность генетической информации, заложенной в оплодотворенном яйце, используется для направления развития дифференцирующегося организма? Серьезная постановка этой проблемы оказалась возможной уже несколько десятилетий назад; информация, касающаяся химических аспектов развития эмбрионов кур, морских ежей и других видов, накапливалась в течение многих лет. Но лишь в настоящее время благодаря более глубокому пониманию молекулярно-генетических механизмов созданы предпосылки для успешной разработки данной проблемы. Все возрастает объем работ, в которых рассматриваются различные механизмы, обеспечивающие определенные изменения в ходе развития простых организмов, например споруляцию или образование ресничек у бактерий, происходящее на свету образование фотосинтетического аппарата у *Euglena* и др. Однако этот удивительный процесс изучен пока еще недостаточно. Объем имеющейся информации невелик, и проблема в целом представляет собой обширное поле для будущих исследований.

Вторжение микроорганизмов или чужеродных макромолекул в организм взрослого животного вызывает «иммунный ответ», благодаря которому внедряющийся агент обезвреживается. Каким образом организм распознает чужеродный характер таких агентов и делает их безвредными? Этот процесс, приводящий к образованию антител, оказался удивительно сложным, требующим участия клеток разных типов; его природа успешно расшифровывается. Основные данные по этой проблеме приведены в гл. 30.

С помощью каких механизмов клетки «узнают» друг друга? В процессе развития возникают многочисленные ситуации, при которых клетки определенного типа должны узнавать друг друга и объединяться. В некоторых случаях это необходимо для образования определенного паренхиматозного органа, например печени; в других — специфическая нервная клетка должна образовать си-

напс только с определенной другой нервной клеткой, чтобы сформировался путь, ведущий от периферических участков тела в одну из областей центральной нервной системы. В настоящее время интенсивно исследуются основы такой способности клеток узнавать друг друга. С механизмами, обеспечивающими клеткам возможность узнавать «своих», тесно связана их способность распознавать «чужие» клетки. Реализуемая при участии клеток способность к иммунному ответу лежит в основе ограничения роста клеток злокачественных опухолей; с ним связана способность или неспособность хозяина «переносить» присутствие трансплантатов чужой ткани (или органа); в некоторых случаях он может вызывать аутоиммунные заболевания. Достижения биохимии в этой области рассмотрены в гл. 30 и 47.

Можно ли описать формы поведения на языке химии? С появлением в процессе эволюции нервных клеток и последующим развитием примитивной нервной системы, а затем высокоорганизованного мозга у *Homo sapiens* формировались все более сложные формы поведения. Ответы на возбуждающие стимулы, осуществляемые у большинства видов при участии нервных клеток, являются предопределенными и видоспецифическими, например плетение паутины, брачные танцы птиц. Очевидно, что познавательные способности присущи только ограниченному числу видов. Вместе с тем можно сформулировать ряд фундаментальных вопросов, относящихся к функционированию нервных клеток всех видов. Какие химические процессы лежат в основе проведения импульса по нервному аксону, обеспечивают передачу стимулирующих или тормозящих сигналов между нервными клетками и между нервными и мышечными клетками? Если данная нервная клетка образует с другими клетками многочисленные контакты, по которым поступают как стимулирующие, так и тормозящие импульсы, то каким образом получаемая «информация» суммируется для формирования окончательного «решения»? Сумма рассмотренных выше простейших элементов активности нервной системы формирует «поведение». Современные представления об этих процессах суммированы в гл. 37. Представления о химических основах преобразования такой активности в наблюдаемое поведение, процесс познания и т. д. весьма фрагментарны. Пока еще очень мало данных, позволяющих понять природу процессов, интегрирующих функции нервной и эндокринной систем; значительные усилия экспериментаторов направлены на выявление возможных химических основ памяти. Хотя биохимики признают, что «разум» и «личность» — это выражение особенностей химической структуры и метаболизма мозга, понимание этих феноменов представляется делом отдаленного будущего.

Можно ли описать заболевание на молекулярном уровне?

Большим триумфом в этой области было выяснение молекулярных основ этиологии и патогенеза болезней, вызванных витаминной недостаточностью (часть шестая) и гормональными нарушениями (часть пятая). Это позволило предотвратить гибель многих миллионов людей от неполноценного питания и сделало возможным успешное лечение сотен тысяч больных с эндокринными расстройствами. Более того, современное развитие науки позволило синтезировать лекарства, которые облегчают течение ряда болезней. Так, например, ингибиторы карбоангидразы эффективны при лечении глаукомы и уремии, ингибитор ксантиноксидазы — при подагре, ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот при лейкемии, предшественник определенного нейромедиатора — при паркинсонизме и т. д. В последнее время в результате детальных исследований удалось выявить у человека около 1500 нарушений метаболизма, имеющих генетическую природу. Более трети из них возникает из-за мутаций в определенном специфическом гене. Имеющиеся данные позволяют считать, что каждый из нас является носителем не менее чем полудюжины дефектных генов. Эта обширнейшая область человеческого самопознания начала развиваться лишь в последнее время.

Ежегодно открываются буквально дюжины все новых нарушений метаболизма, имеющих генетическую природу (гл. 27). Лишь в немногих случаях, однако, эти открытия способствовали успеху терапевтического лечения. Тем не менее сочетание данных генетического анализа и исследования клеток плода, полученных из амниотической жидкости, позволяет сделать все более реальным предсказание возможных нарушений и обоснованно рекомендовать прервать беременность, которая могла бы закончиться рождением физически или умственно отсталого ребенка. Можно надеяться, что развитие фундаментальных исследований создаст предпосылки для успешного выяснения таких вопросов, как причины возникновения атеросклероза, природа опухолевого перерождения первоначально нормальных клеток, происхождение многих неврологических заболеваний и даже, может быть, некоторых из наиболее важных психических расстройств.

Частичные ответы на перечисленные выше основные вопросы, стоящие перед биохимией, получены главным образом в течение нескольких последних десятилетий. Эффективность исследований в значительной степени определялась появлением новых более совершенных методов анализа. Для иллюстрации приведем только один пример. Наиболее важная установленная лишь недавно биологическая закономерность, заключающаяся в том, что в генетическом аппарате закодирована информация о точной аминокислотной последовательности полипептидной цепи белка, была выявлена после того, как удалось показать, что у больных серповидно-

клеточной анемией (врожденное рецессивное заболевание) имеет место замена одной из аминокислот в β -цепи гемоглобина (гл. 26). Это исследование оказалось возможным лишь после того, как с помощью электрофоретического анализа были обнаружены различия в заряде гемоглобина нормальных людей и больных серповидноклеточной анемией. Далее, природу аминокислотной замены было невозможно установить до тех пор, пока не стали доступны аналитические методы, позволяющие расшифровывать аминокислотную последовательность белков. Эти методы в свою очередь разработаны на основе колоночной и бумажной хроматографии (гл. 5) и т. д. Чтобы понять, каким образом единственная аминокислотная замена оказывает такое значительное влияние на физические свойства гемоглобина, потребовалось знание трехмерной структуры данного белка. Такая информация может быть получена с помощью рентгеноструктурного анализа. Однако необходимой предпосылкой является получение крупных кристаллов нативного белка и изоморфных кристаллов комплексов белка со специфически связанными ионами тяжелых металлов (гл. 6). Кроме того, анализ громадного объема информации, получаемой при рентгеноструктурных исследованиях, оказался возможным лишь после появления счетно-решающих устройств высокой эффективности. Только тогда удалось обнаружить и оценить последствия точечной мутации в структуре ДНК, которая приводит к серповидноклеточной анемии. Независимо от специфики изучаемой проблемы для проведения современного биохимического исследования практически всегда необходим набор оборудования, включающий высокоскоростные центрифуги с охлаждением, регистрирующие спектрофотометры, сцинтилляционные счетчики, аминокислотные анализаторы и т. д. Поэтому можно предвидеть, что дальнейшее принципиальное усовершенствование лабораторного оборудования и методических приемов приведет к новому скачку в развитии биохимии.

Биохимия — это не изолированная область знаний; она стала языком биологии, основой для понимания различных аспектов биологических и медицинских наук. Еще со времен Аристотеля изучавшие биологию стремились установить корреляцию между структурой и функцией. Эти попытки продолжаются; выяснение взаимосвязи биологической функции и молекулярной структуры и является главной задачей биохимии.

ЧАСТЬ ПЕРВАЯ

ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ КЛЕТКИ

Глава 2

УГЛЕВОДЫ

Углеводы, многие из которых называются просто сахарами, встречаются во всех растениях и животных и имеют самые разнообразные функции. Одни используются как источники энергии в процессах метаболизма, другие являются компонентами ряда классов веществ клетки, включая нуклеиновые кислоты и витаминсодержащие кофакторы. Многие сложные углеводы играют важную структурную роль как компоненты клеточных стенок растений и бактерий. Часто в тканях животных углеводы находятся в комбинации с белками (гликопротеины).

Центральным вопросом биохимии является рассмотрение функций химических компонентов живого на молекулярном уровне.

Таким образом, чтобы понять функцию углеводов, обсуждаемую в последующих главах, необходимо ознакомиться с молекулярными структурами и основными химическими свойствами углеводов.

2.1. Классификация

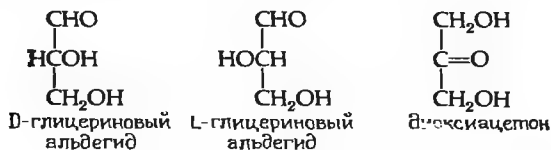
Углеводы являются либо полиоксисалями, либо поликетонами, либо производными тех и других. Они имеют молекулярную массу от <100 до $1\,000\,000$ и более и представляют собой белые твердые вещества, незначительно растворимые в органических растворителях, но, за исключением некоторых

высокомолекулярных полисахаридов, хорошо растворимые в воде.

Углеводы могут быть разделены на четыре группы: *моносахариды*, *производные моносахаридов*, *олигосахариды* и *полисахариды*. Моносахариды имеют низкую молекулярную массу, и, согласно их названию — «углеводы», — могут считаться гидратами углерода с общей формулой $(\text{C}(\text{OH})_n)_n$, где n принимает значения от 3 до 9. Производные моносахаридов содержат вместо карбонильных и гидроксидных групп (или в дополнение к ним) другие функциональные группировки. Олигосахариды и полисахариды, являющиеся продуктами конденсации остатков моносахаридов друг с другом с образованием ацетальных связей, представлены большим числом соединений. Самый простой олигосахарид образуется из двух моносахаридов и называется *дисахаридом*. Олигосахариды, полученные из трех, четырех или пяти моносахаридов, называются *три*-, *тетра*- и *пентасахаридами* соответственно. Полисахариды являются полимерами с высокой молекулярной массой и образуются конденсацией большого числа моносахаридных остатков либо одного типа (*гомополисахариды*), либо нескольких типов (*гетерополисахариды*).

2.2. Моносахариды

Глицериновый альдегид и диоксиацетон — единственно возможные моносахариды, содержащие три атома углерода, — называются *триозами*. Примечательным является наличие у глицеринового альдегида одного асимметрического центра и, следовательно, двух форм с различными конфигурациями — *энантиомеров*: *D*-глицеринового и *L*-глицеринового альдегидов:



Моносахариды, содержащие свободную альдегидную группу, называются *альдозами*. Если в состав молекулы входит кетогруппа, то моносахарид носит название *кетозы*. Глицериновый альдегид (*D* или *L*) — *альдотриоза*, диоксиацетон — *кетотриоза*. Эти термины характеризуют не только функциональные группы, но и число атомов углерода. Общие названия для альдоз указывают на число атомов углерода в молекуле. Так, например, *тетрозы*, *пентозы*, *гексозы* и *гептозы* содержат четыре, пять, шесть и семь атомов угле-

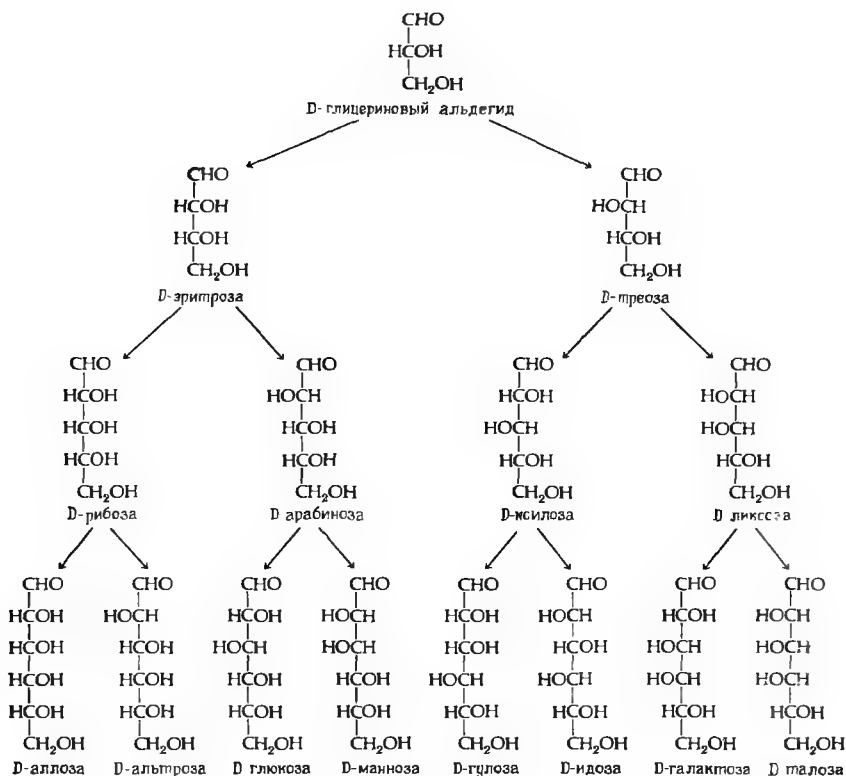


Рис. 2.1. Ряд D-альдоз. Формулы L-альдоз — зеркальное отражение приведенных структур

рода соответственно. Общие названия кетоз образуются вставкой суффикса «ул» в соответствующие названия альдоз, т. е. пентулоза, гексулоза и гептулоза.

2.2.1. Отнесение конфигурации

Альдозы с тремя и более углеродными атомами и кетозы с четырьмя и более углеродными атомами содержат асимметрические центры, образованные атомами углерода с четырьмя различными заместителями. Таким образом, в основу номенклатуры моносахаридов положена конфигурация молекулы относительно каждого ее асимметрического центра. На рис. 2.1 и 2.2 приведены линейные структурные формулы D-альдоз и D-2-кетоз и даны общепринятые тривиальные названия для каждого соединения. Во всех формулах первый углеродный атом находится сверху. Другие атомы нумеру-

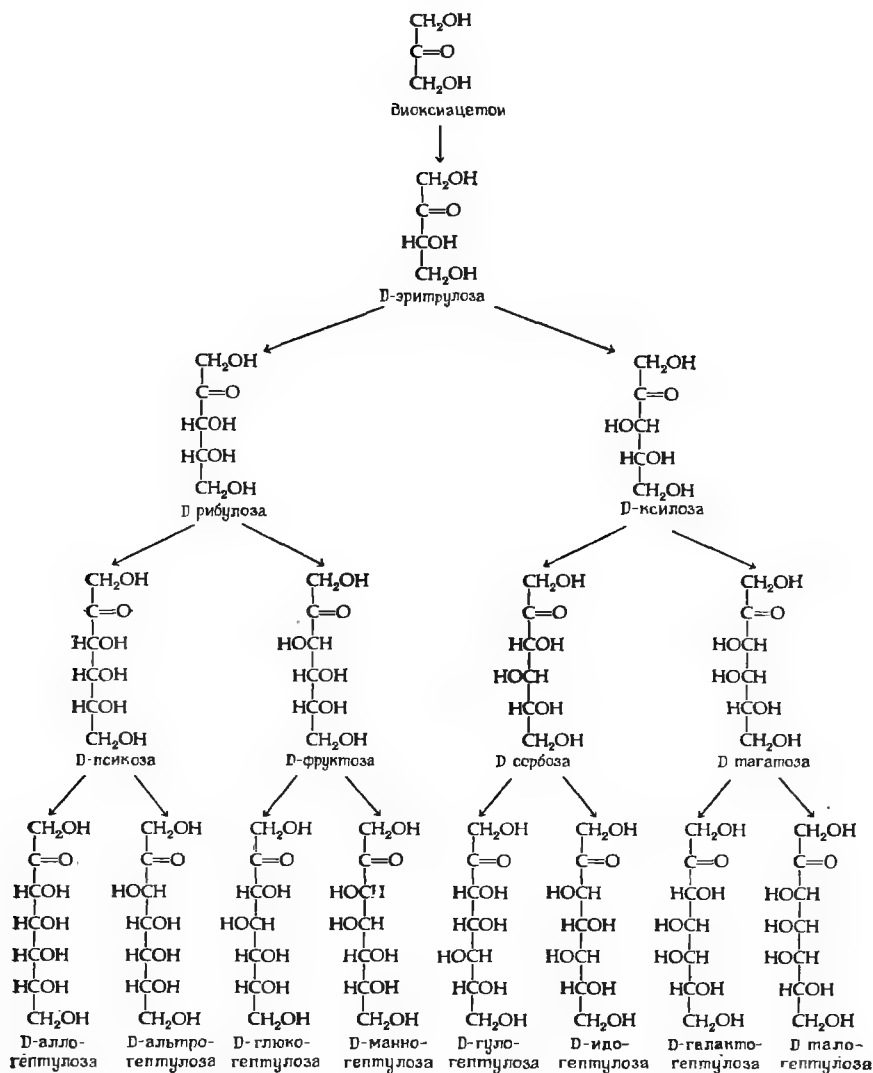
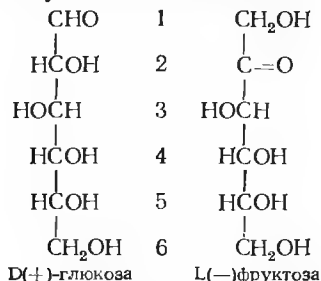


Рис. 2.2. Ряд D-кетоз. Формулы L-кетоз — зеркальное отражение приведенных структур

ются последовательно. Эти формулы называются *проекциями Фишера*, поскольку впервые были предложены Эмилем Фишером более 75 лет назад. Следует отметить, что использование букв **D** и **L** в названиях моносахаридов основывается на различии в конфигурации, а не на знаке оптического вращения. Буквами **D** и **L**

обозначается конфигурация; если же в названии соединения необходимо отразить знак оптического вращения, то вводятся символы $+$ и $-$. Так, например, правовращающая D -глюкоза и левовращающая D -фруктоза могут быть названы



В соответствии с правилом буквы D и L в названии моносахарида указывают на конфигурацию относительно асимметрического центра, наиболее удаленного от альдегидной группы молекулы. Для гексоз таким атомом является углерод C-5. Двум стереоизомерам глицеринового альдегида были приписаны условные конфигурации, совпадающие с абсолютными, как теперь установлено.

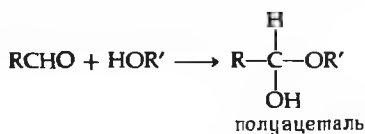
Отнесение всех углеводов к D - или L -ряду осуществляется путем сравнения конфигурации «концевого» асимметрического центра с конфигурацией соответствующего стереоизомера глицеринового альдегида. Таким образом, структурные формулы для тетроз, пентоз и гексоз, приведенные на рис. 2.1, могут быть построены на основе формулы D -глицеринового альдегида путем последовательного присоединения атомов углерода с заместителями соответствующих конфигураций, как это показано стрелками.

Некоторые названия кетоз на рис. 2.2 не вполне правильны. Например, фруктоза — тривиальное и широко распространенное название, но оно не указывает на стереохимическое соответствие этого соединения какой-либо альдозе (рис. 2.1). Три асимметрических центра фруктозы имеют ту же конфигурацию, что и у D -арабинозы, и фруктоза должна была бы иметь название D -арабиногексулоза. Также неправильное название имеет D -рибулоза, так как она стереохимически подобна эритрозе, но не рибозе; ее правильное название — D -эритропентулоза. На рис. 2.2 правильные названия имеют гептулозы, но не пентулозы и гексулозы. Тем не менее, поскольку для этих соединений такие неправильные названия широко используются в биохимии, они сохранены на рис. 2.2 и вообще в данной книге.

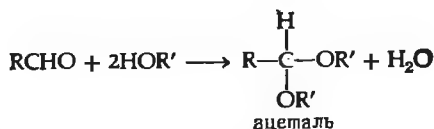
2.2.2. Циклические формулы альдоз и кетоз

Линейные формулы, показанные на рис. 2.1 и 2.2, удобны при изображении различных стереоизомеров моносахаридов, но они

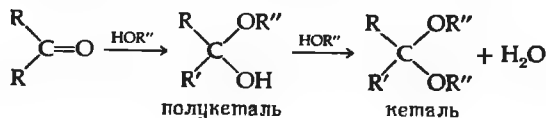
не демонстрируют дополнительный центр асимметрии, имеющийся во многих углеводах. Открытие дополнительного центра асимметрии в глюкозе вытекало из наблюдения, что оптическое вращение свежеприготовленных растворов глюкозы меняется во времени. В конце концов были выделены две формы глюкозы с различным оптическим вращением; одна форма с $[\alpha]_D^{20} = +122,2^\circ$ была обозначена как α -D-глюкоза, другая с $[\alpha]_D^{20} = +18,7^\circ$ — как β -D-глюкоза. Если оптическое вращение свежеприготовленных растворов α - или β -формы измерять через определенные промежутки времени, то можно заметить, что удельное вращение каждой формы постепенно изменяется и, наконец, достигает $+52,7^\circ$. Это явление, названное *мутаротацией*, характерное не только для глюкозы, наблюдалось для ряда гексоз и пентоз, а также для некоторых дисахаридов. Мутаротация объясняется тем, что моносахариды, подобно другим альдегидам и кетонам, легко образуют полуацетали и ацетали или полукетали и кетали соответственно. Когда альдегид реагирует с одной молекулой спирта, образуется полуацеталь



При взаимодействии с двумя эквивалентами спирта альдегиды дают ацетали

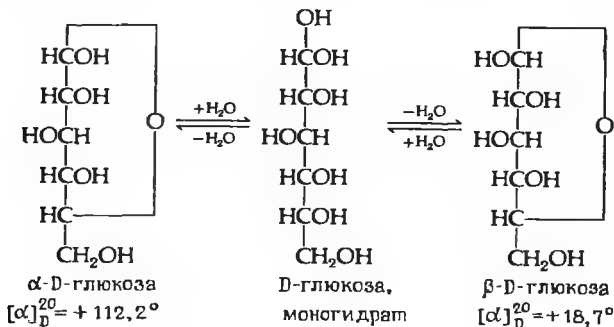


Аналогично кетоны образуют полукетали и кетали



Полуацетали обладают центром асимметрии у атома углерода, который первоначально нес карбонильную группу; то же самое имеет место в случае полукеталей, образующихся из несимметричных кетонов, например из метилэтилкетона. Ацетали и кетали также имели бы асимметрический центр в случае, если бы карбонильные группы реагировали с двумя различными спиртами. Альдегид-

ная группа глюкозы образует полуацетали не только посредством межмолекулярных взаимодействий со спиртами, как было показано выше, но и путем внутримолекулярных реакций с собственными гидроксидными группами. Таким образом, глюкоза образует стабильные внутримолекулярные полуацетали с гидроксидной группой при атоме С-5, давая два различных стереоизомера, которые подвергаются мутаротации, α -D-глюкозу и β -D-глюкозу. Подобно другим полуацеталам, α - и β -формы глюкозы обладают центром асимметрии у первоначально альдегидного атома углерода

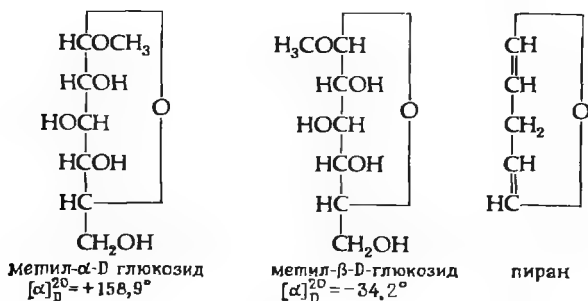


Атом С-1, новый центр асимметрии, является *аномерным атомом* углерода, и альдозы, которые отличаются лишь конфигурацией этого атома углерода, называются *аномерами*. Таким образом, α - и β -D-глюкозы — аномеры. Предполагается, что мутаротация включает в себя взаимопревращения α - и β -форм с промежуточной стадией образования альдегида с открытой цепью или его гидрата. В водных растворах содержание альдегида с открытой цепью в равновесной смеси очень мало: для глюкозы $\sim 0,024\%$.

Число стереоизомеров для любого соединения равно 2^n , где n — число асимметрических центров в молекуле. С помощью проекций Фишера (рис. 21) можно изобразить $2^4=16$ стереоизомеров глюкозы. Молекула глюкозы обладает пятью центрами асимметрии; следовательно, возможны $2^5=32$ изомера, включая α - и β -формы каждой альдогексозы. Буква α используется тогда, когда в плоскостной проекции гидроксидная группа при атоме С-1 находится на той же стороне, что и кислородный атом кольца. Буква β соответствует форме, у которой эта гидроксидная группа находится на стороне, противоположной кислородному атому кольца. Среди углеводов D-конфигурации α -изомер всегда имеет более положительное удельное вращение, чем β -изомер. В 1-ряду (проекционные формулы получаются путем зеркального отражения D-структур, изображенных выше) аномером с более отрицательным вращением является α -аномер.

Глюкоза при обработке минеральной кислотой в присутствии метанола также образует ацетали. Полученные производные — метилглюкозиды — сохраняют либо α -, либо β -конфигурацию при C-1.

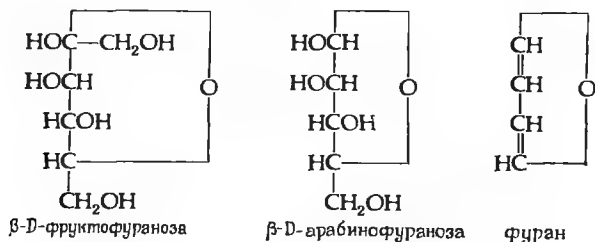
Очевидно, что α - и β -D-глюкозы, как и соответствующие им метилглюкозиды, обладают шестичленным кольцом, образованным путем соединения первого и пятого углеродных атомов кислородным мостиком. Углеводы, содержащие такое кольцо, носят название *пираноз* из-за их сходства с пирановым циклом. Альдозы, содержащие кольцо такого типа, называются *альдопиранозами*. Таким образом, α -D-глюкоза и β -D-глюкоза есть не что иное, как α -D-глюкопираноза и β -D-глюкопираноза соответственно, а их метилглюкозиды — метил- α -D-глюкопиранозид и метил- β -D-глюкопиранозид.



Метилглюкозиды являются представителями группы соединений, известных как *гликозиды*. Гликозиды называются в соответствии с названиями моносахаридов, производными которых они являются, т. е. α - и β -глюкозиды, α - и β -фруктозиды и α - и β -рибозиды. Биологически важные гликозиды образуются при взаимодействии полуацетальной или полукетальной гидроксидной группы моносахаридов с гидроксидной группой другого моносахарида. Углеводы, объединенные таким способом, образуют многие типы олиго- и полисахаридов. Необходимо отметить, что реакционная способность полуацетальной и спиртовой гидроксидных групп резко различна, а гликозидный кислородный мостик, хотя формально и похож на эфирный мостик, не обладает химической стабильностью, характерной для алифатических простых эфиров.

Альдозы могут существовать в виде соединений с пятичленным кольцом, аналогичным фурану; в этом случае их называют *альдофуранозами*. Пятичленные кольца обычны для альдопентоз в олигосахаридах. Так, β -D-арабиноза может быть названа β -D-арабинофуранозой, а β -D-рибоза — β -D-рибофуранозой. Кетогексозы

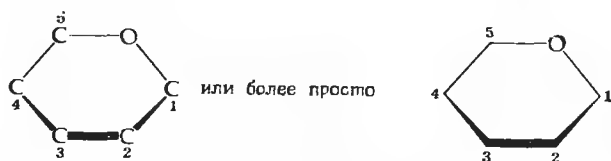
также образуют стабильные пятичленные циклы, т. е. β -D-фруктоза есть β -D-фруктофураноза.



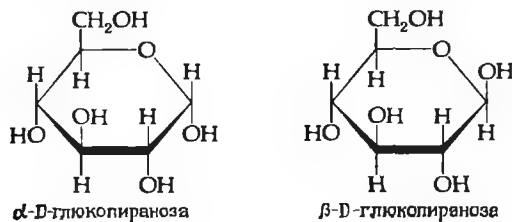
Такого рода полукетали при взаимодействии их полукетальной гидроксидной группы со спиртом также образуют соответствующие *фуранозиды*, структура которых аналогична пиранозидам.

Аналогично пентозам альдозы и кетозы с более длинной цепью также могут образовать либо фуранозное, либо пиранозное кольцо. Образование наиболее стабильного цикла зависит не только от конфигурации каждого асимметрического центра, но и от природы заместителей при карбонильной и гидроксидной группах. Чтобы установить точный размер кольца альдозы или кетозы, необходим детальный структурный анализ.

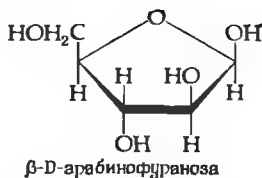
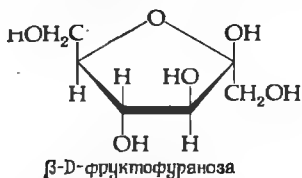
Для изображения циклических структур пираноз и фураноз часто прибегают к шестиугольникам и пятиугольникам, называемым *проекциями Хеурса*. Плоскость такого кольца изображается перпендикулярно плоскости бумаги, причем связи, расположенные ближе к читателю, выделяются более жирной линией.



В соответствии с этим две формы D-глюкопиранозы изображаются как



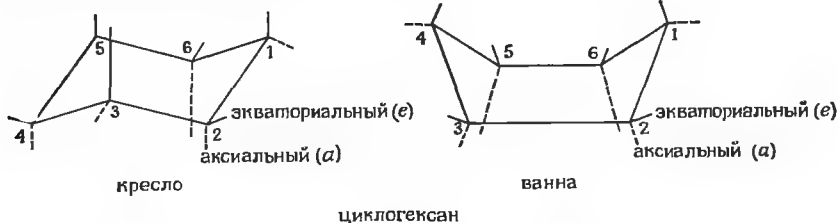
Аналогично фуранозы изображают как



При переходе от одного способа изображения к другому левая и правая стороны в линейном изображении углеродной цепи эквивалентны соответственно верхней и нижней сторонам плоскости кольца. Исключение имеет место для заместителей у атома C-5 глюкозы. В линейной формуле атом водорода находится слева от углерода, в то время как в циклической формуле — ниже плоскости кольца. Для более детального знакомства с переходом от линейных формул к циклическим следует обратиться к литературе по химии углеводов.

2.2.3 Конформация

Проекции Фишера и Хеуорса не только удобны для изображения, но и облегчают понимание химии альдоз и кетоз. Они, однако, не позволяют точно описать длину связей, углы между атомами кольца и заместителями при каждом атоме углерода, т. е. не дают представления о конформации — пространственной структуре моносахаридов. Структурный анализ гексоз показывает, что они имеют конформации, аналогичные циклогексану. В бензоле шесть атомов углерода лежат в одной плоскости, в то время как нормальные длины связей и нормальные величины углов между ними в циклогексане препятствуют плоскостному расположению его шести углеродных атомов. Поэтому циклогексан имеет два различных типа конформации, называемых *креслом* и *ванной*, в которых валентные углы не деформированы.

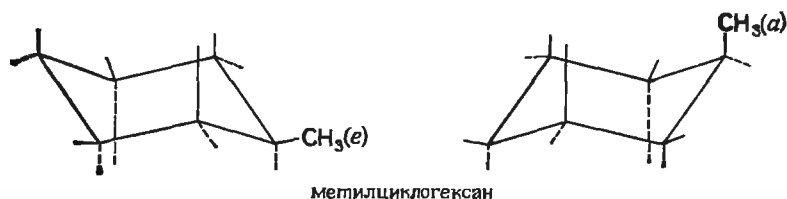


В обеих конформациях циклогексана при каждом атоме углерода один атом водорода направлен точно или почти перпендикулярно вверх, а другой — точно или почти перпендикулярно вниз. Шесть атомов водорода (β -атомы), ори-

ентированных вверх, изображены сплошной линией. Атомы водорода (α -атомы), ориентированные вниз, обозначены прерывистой линией. 12 атомов водорода циклогексана подразделяются на две группы: *аксиальные* (связь C—H параллельна оси симметрии кольца) и *экваториальные* (связь C—H параллельна не примыкающей к ней стороне кольца).

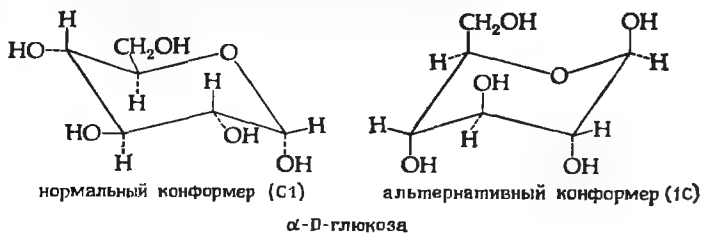
Очевидно, что молекулы с конформациями *кресла* и *ванны* имеют разные свойства вследствие различий во взаимодействии разным образом расположенных в молекуле групп. В конформации ванны аксиальные и экваториальные заместители находятся наиболее близко (*заслоненная конформация*) и между ними наблюдается максимальное взаимодействие. Напротив, заместители в конформации кресла расположены так, что взаимодействие между ними минимальное (*гош-конформация*). Таким образом, на основе только этого факта можно предположить, что «кресло» является гораздо более устойчивой конформацией, чем «ванна». В самом деле, различие в энергии между этими конформациями составляет 5–6 ккал/моль. «Кресло» — более жесткая структура, в то время как для «ванны» существует несколько различных вариантов и эта структура очень подвижна.

Способ изображения с учетом конформаций — нечто большее, чем просто упражнения в проекционной геометрии. Он раскрывает свойства молекулы, которые не заметны при других изображениях структуры. Из анализа таких структур следует вывод, что заместитель, в особенности объемный, в экваториальном положении находится в более выгодном энергетическом состоянии, чем в аксиальном положении. Поэтому, например, в равновесии между конформационными изомерами метилциклогексана



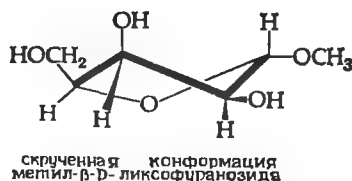
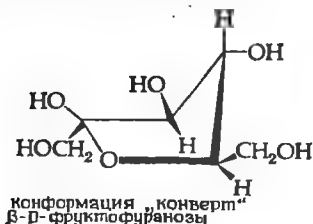
экваториальная форма преобладает. Как можно было ожидать, экваториальные гидроксидные группы должны более легко этерифицироваться, чем аксиальные. Отсюда вытекают многие известные различия в реакционной способности группировок в зависимости от того, являются ли они экваториальными или аксиальными.

В пиранозах присутствие атома кислорода незначительно искажает кольцо по сравнению с циклогексаном, но моносахариды также существуют в формах кресла и ванны. Анализ молекулярных моделей показывает, что существует восемь различных конформаций как для α -, так и для β -D-глюкопиранозы, но только две из них — в форме кресла. Одна из двух возможных конформаций кресла, в которой заместители при атомах C-2 — C-5 занимают экваториальные положения, называется *нормальным конформером* (C1)



Другая форма кресла — *альтернативный конформер* (1C) — имеет аксиальную ориентацию гидроксидных групп при атомах С-2 — С-5. Альтернативный конформер для глюкозы гораздо менее устойчив, чем нормальный, что объясняется скоплением аксиально ориентированных полярных заместителей по одну сторону от плоскости кольца.

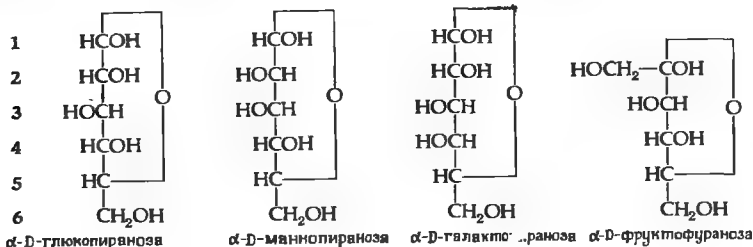
Менее разработаны представления о конформации фураноз, но вероятнее всего, что фуранозное кольцо не плоское и может существовать либо в конформации *конверт* (E), либо в *скрученной* («*твист*»-) конформации (T). В конформации *конверт* четыре атома, включая атом кислорода кольца, находятся в одной плоскости, а пятый выступает из нее. В скрученной конформации три соседних атома находятся в одной плоскости, а два других выше или ниже ее. В принципе возможны несколько скрученных конформаций и конформаций «конверт», но энергетические барьеры между ними низки и, по-видимому, взаимные превращения происходят быстро.

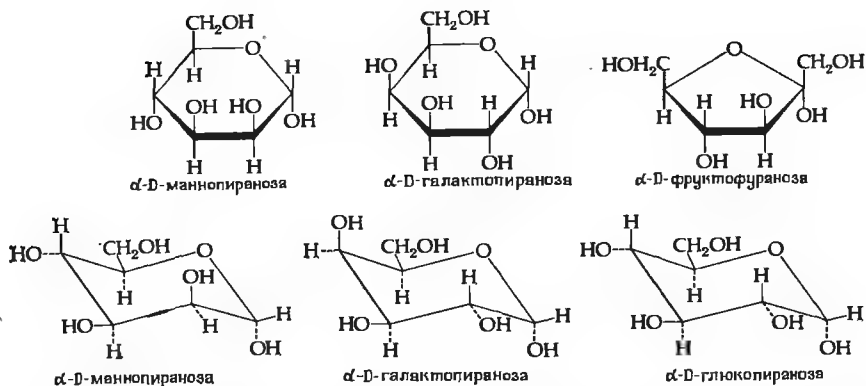


Конформационные формулы удобны также в химии стероидов (гл. 3) и будут использованы в тексте в тех случаях, когда это необходимо.

2.2.4. Биологически важные гексозы и пентозы

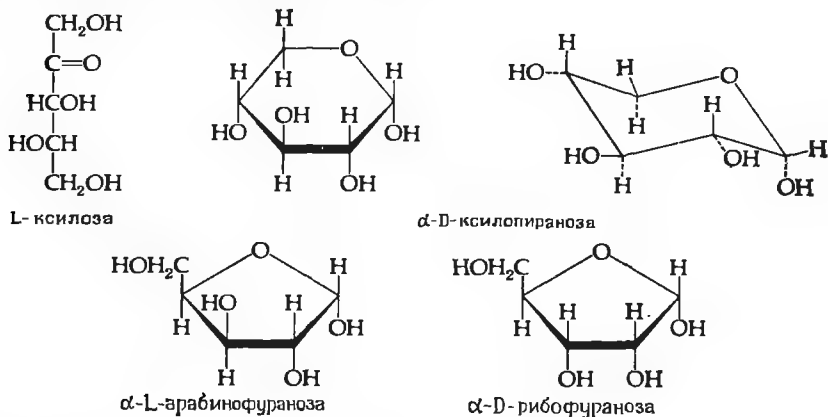
В природе только глюкоза и фруктоза встречаются в значительных количествах. Некоторые другие моносахариды также распространены либо как блоки, входящие в состав дисахаридов и полисахаридов, либо в других соединениях. Среди наиболее распространенных гексоз можно перечислить такие альдогексозы, как глюкоза, манноза и галактоза, и кетогексоза — фруктоза. При сравнении различных структурных изображений α-форм этих соединений раскрываются важные аналогии между этими углеводами.





Глюкоза и манноза являются *эпимерами* (различаются лишь конфигурацией одного атома углерода) по атому С-2. Глюкоза и галактоза — эпимерная пара по атому С-4. Фруктоза отличается от других моносахаридов тем, что ее аномерный атом находится не в С-1, а в С-2 положении, но она идентична глюкозе и маннозе по конфигурации при атомах 3, 4 и 5.

Среди пентоз, встречающихся в природе, имеются альдозы (D-арабиноза, D-рибоза и D-ксилоза) и кетоза (L-ксилулоза). α -D-Ксилоза образует пиранозное кольцо и в этой форме структурно аналогична глюкозе, за тем исключением, что не имеет при атоме С-5 оксиметильной группы.



2.2.5. Производные моносахаридов

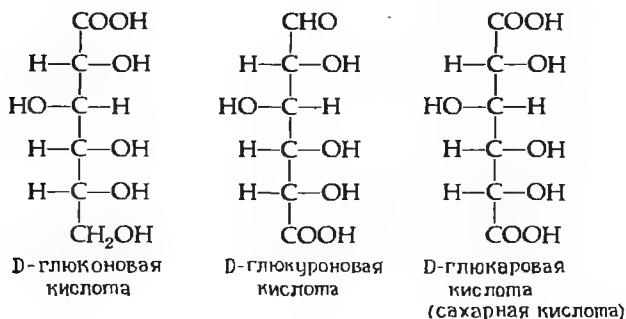
Многие производные моносахаридов являются компонентами живых организмов. Среди наиболее важных производных — сахарные кислоты, аминсахара и дезоксисахара.

2.2.5.1. Сахарные кислоты

Большинство соединений этой группы образуется окислением С-1 альдегидной или С-6 оксиметильной групп альдоз, либо окислением и той и другой групп. Эти кислоты имеют общие названия альдоновых, уроновых и альдаровых кислот.

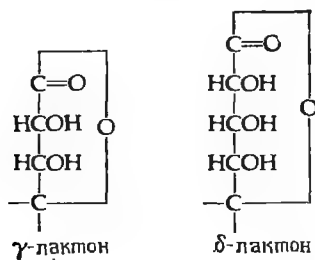


Окисление глюкозы дает следующие кислоты:

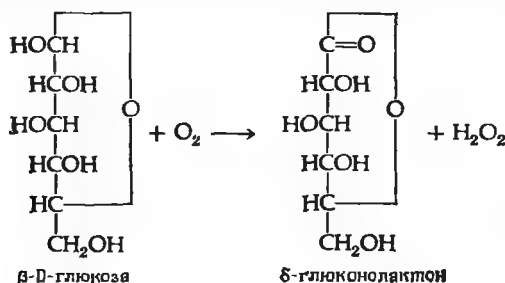


Эти соединения представляют собой сильные кислоты: их соли растворимы в воде и дают нейтральные растворы. Глюконовая кислота нетоксична, хорошо усваивается и часто используется для введения в организм такого катиона, как Ca^{2+} .

Подобно другим γ - и δ -оксикислотам, сахарные кислоты склонны к образованию внутренних эфиров или лактонов с пяти- или чаще шестичленным кольцом.

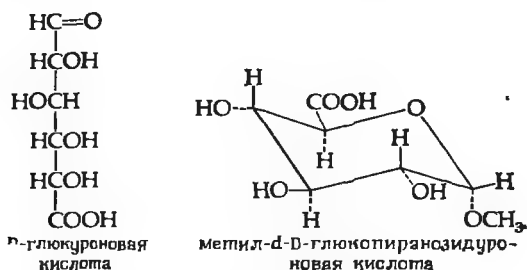


δ-Глюконолактон образуется при аэробном окислении, катализируемом ферментом *глюкозооксидазой* из плесени *Pennicillium notatum*.



Глюкозооксидаза обладает выраженной специфичностью к β-D-глюкозе и используется для количественного определения глюкозы (при этом выделяются эквимольные количества пероксида водорода, которые можно точно определить).

Продукт окисления глюкозы — глюкуроновая кислота — образует гликозиды



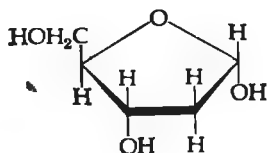
Глюкуроновая кислота присутствует в моче человека в связанном виде, образуя гликозидную связь с окисоединениями, например фенолами и стероидами. Более высокая растворимость в воде глюкозидуроновых кислот по сравнению с соответствующими спиртами способствует транспорту последних в организме. Глюкуроновая кислота может также образовывать эфиры, например, с желчным пигментом билирубином (гл. 32) и является компонентом многих полисахаридов, обсуждаемых ниже и в гл. 15.

Сахарная кислота, имеющая огромное биологическое значение и широко распространенная в животном и растительном мире, — витамин С или аскорбиновая кислота (L-ксилоаскорбиновая кислота), — обсуждается подробно в гл. 50.

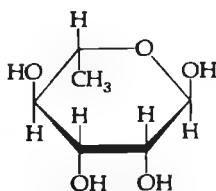
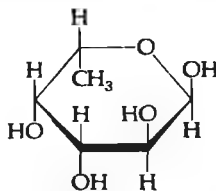
2.2.5.2. Дезоксисахара

Эти углеводы включают соединения, у которых одна или более гидроксидных групп пиранозного или фуранозного кольца замене-

ны атомом водорода. 2-Дезоксирибоза является компонентом нуклеотидных звеньев в дезоксирибонуклеиновых кислотах (гл. 7).

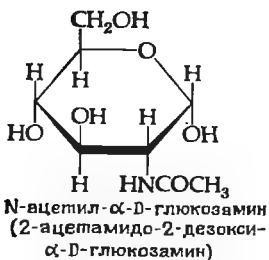
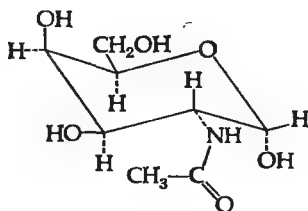
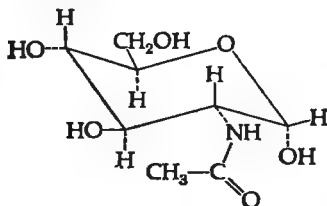
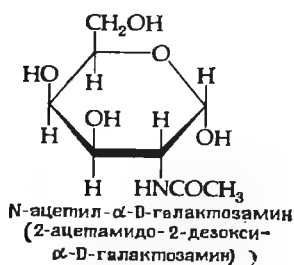
2-дезокси- α -D-рибоза

Рамноза (6-дезокси-L-манноза) и L-фукоза (6-дезокси-L-галактоза) относятся к числу немногих моносахаридов L-конфигурации, найденных в растениях и животных.

 α -L-рамноза α -L-фукоза

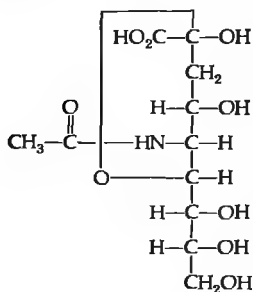
2.2.5.3. Аминосакхара

В этих соединениях гидроксидная группа у одного из углеродных атомов пиранозного кольца замещена аминогруппой. Широко распространены в растениях и животных 2-аминоальдогексозы — D-глюкозамин и D-галактозамин, которые обычно встречаются в виде N-ацетильных производных.

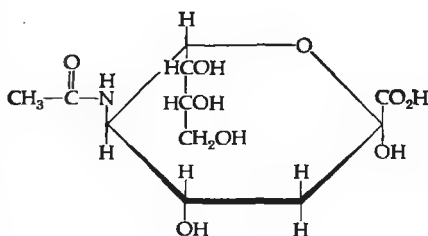
N-ацетил- α -D-глюкозамин
(2-ацетидамо-2-дезокси- α -D-глюкозамин)N-ацетил- α -D-галактозамин
(2-ацетидамо-2-дезокси- α -D-галактозамин)

Глюкозамин является продуктом гидролиза хитина, основного полисахарида наружного скелета насекомых и ракообразных, и встречается в различных полисахаридах животного происхождения, а также некоторых белках (гл. 15 и 38). Галактозамин входит в состав типичных полисахаридов хрящей, хондроитинсульфатов (гл. 38) и некоторых гликофинголипидов (гл. 3).

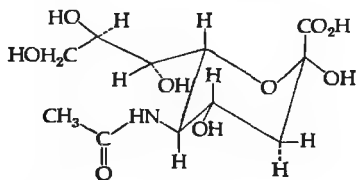
Сиаловые кислоты образуют класс важных кетоз, содержащих девять атомов углерода (кетонозы), и являются ацильными производными 3,5-дидезокси-5-аминононулоновой кислоты, называемой нейраминовой кислотой. N-Ацетилнейраминовая кислота имеет структуру, которую можно изобразить тремя различными способами:



I



II



III

N-ацетил-D-нейраминовая кислота

Хотя пиранозное кольцо соответствует кольцу L-моносахарида, нейраминовая кислота относится к D-моносахаридам, поскольку конфигурация при определяющем атоме C-7 стереохимически подобна таковой для D-глицеринового альдегида.

Сиаловые кислоты широко распространены в бактериях и животных тканях как компоненты липидов, полисахаридов, гликопротеинов и мукопротеинов. Сиаловые кислоты большинства млекопитающих могут быть либо N-ацетил-, либо N-гликолил- (—COCH₂OH)-производными с различным соотношением этих компонентов в разных тканях и видах. Например, бычьи, овечьи и свиные мукопротеины слюны содержат преимущественно N-ацетилпроизводные, в то время как N-гликолилпроизводные преоб-

ладают в строме эритроцитов этих животных. Были также выделены некоторые диацетильные производные, в которых дополнительная ацетильная группа находится при гидроксидной группе атомов С-4, С-7 или С-8. Имеются сведения также о 8-О-метилпроизводном N-ацетилнейраминовой кислоты.

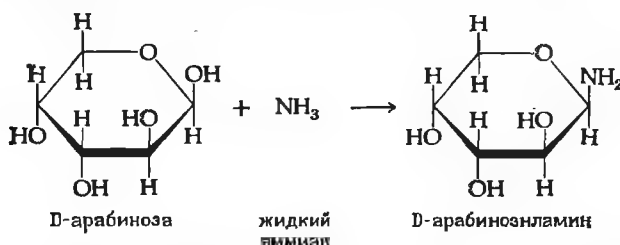
2.2.6. Некоторые реакции моносахаридов

Моносахариды вступают во многие химические реакции, весьма важные для практического использования и исследования углеводов. Некоторые из них упоминались выше. Реакции, обсуждаемые в данном разделе, демонстрируют либо наиболее важные свойства углеводов, либо типы реакций, часто встречающиеся в их метаболизме.

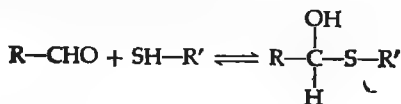
2.2.6.1. Реакции по аномерному атому углерода

Как отмечалось выше (разд. 2.2.2), при реакции моносахаридов с простыми спиртами легко образуются ацетали и кетали. Таким же образом возможен и синтез дисахаридов, однако он требует нескольких стадий.

Альдозы и кетозы также реагируют по аномерным атомам углерода с амином с образованием гликозиламинов, например

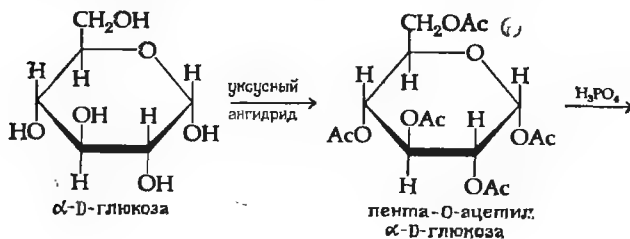


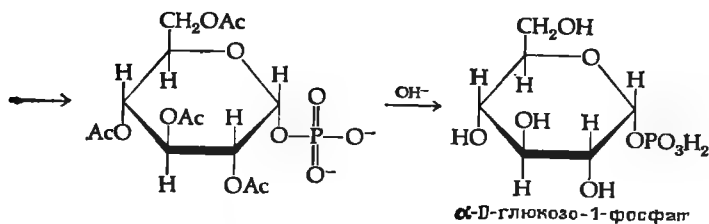
С участием аномерных атомов углерода протекает также реакция образования тиополуацеталей или тиополукеталей:



2.2.6.2. Эфиры фосфорной кислоты

Эфиры фосфорной кислоты и моносахаридов образуются разными способами, включая реакции, приведенные ниже:

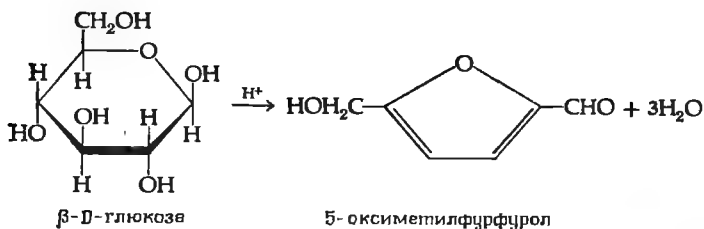
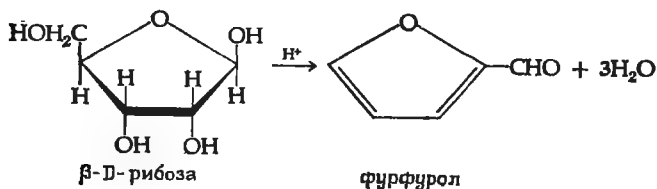




Эфиры фосфорной кислоты занимают уникальное место в биохимии и встречаются во многих углеводах и их производных.

2.2.6.3. Дегидратация

В сильных минеральных кислотах происходит дегидратация пентоз и гексоз



Фурфурол и оксиметилфурфурол легко полимеризуются; при этом получается коричневая смола. Они также конденсируются с различными фенолами, образуя характерно окрашенные продукты; многие цветные реакции на углеводы основаны на этом свойстве (табл. 2.1).

2.2.6.4. Перегруппировка в щелочной среде

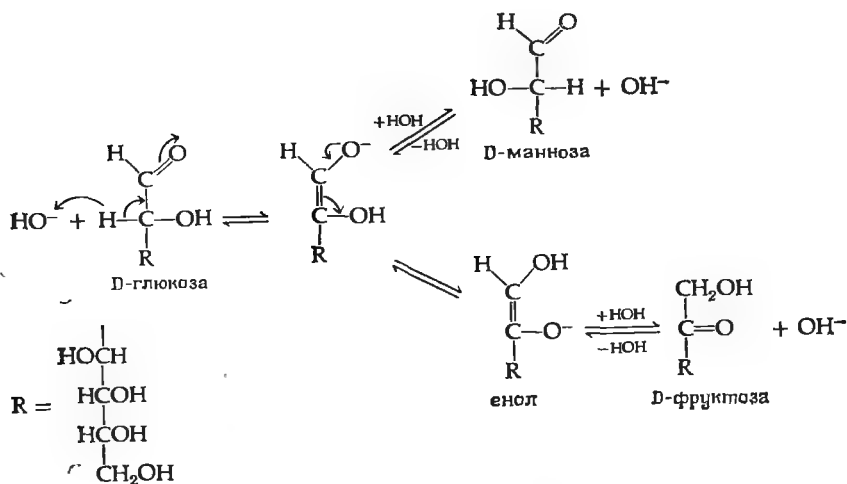
В холодном разбавленном щелочном растворе глюкоза образует маннозу и фруктозу. Механизм реакции, возможно, включает енолизацию, которая сопровождается диссоциацией водорода от атома углерода, примыкающего к кар-

Таблица 2.1
Цветные реакции углеводов^a

Реагент	Тип углевода	Примечание
α -Нафтол (реакция Молиша), триптофан, аминоксантин	Все альдозы и кетозы	Более чувствительна для кетоз
Резорцин (реакция Селиванова)	Кетогексозы	
Цистеин/карбазол	Кетогексозы, кетопентозы, метилпентозы, диоксиацетон	
Карбазол	Все углеводы, включая уроновые кислоты; дезоксипентозы	Характерное окрашивание с различными углеводами
Цистеин/ H_2SO_4	Многие углеводы, включая полисахариды; обычно используется для гексоз	Неодинаковое окрашивание с различными углеводами
Антроп	То же	То же
Орцин	Пентозы, гептулозы, уроновые кислоты	Окрашивание, обусловленное присутствием других углеводов, может быть ликвидировано независимыми методами; уроновые кислоты декарбоксилируются до пентоз и затем вступают в реакцию
Нафтилрезорцин	Уроновые кислоты	
Ацетилацетон- <i>n</i> -диметил-аминобензальдегид	Гексозамины	
Нитрит/индол	»	Аминосакхара не дают окрашивания без предварительного дезаминирования нитритом
Дифениламин	Моно- и дидезокспентозы	
Триптофан/ $HClO_4$	Дезокспентозы	
Индол/ HCl	»	
Лейкофуксин (реакция Фойльгена)	»	
Тиобарбитуровая кислота	Спаловые кислоты	

^a Приведены реагенты общего назначения и углеводы, для которых каждая реакция является характерной. Все приведенные реакции осуществляются в сильноокислой среде. Ни одна из них не является строго специфичной, за исключением пробы на гексозамины, все остальные реакции дают как моно-, так и полисахариды.

боильной группе:



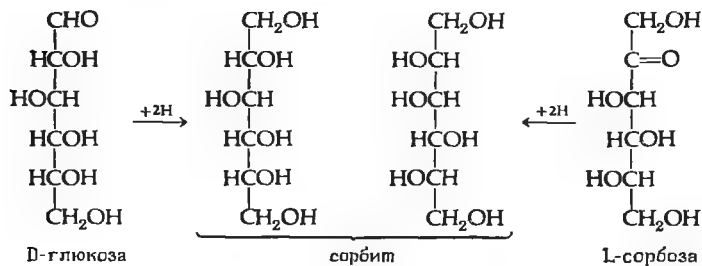
Так образуются эпимеры — глюкоза и манноза.

В горячих щелочных растворах моносахариды реагируют с некоторыми окисляющими агентами, такими, как Cu^{2+} , Ag^+ и $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, давая смесь продуктов окисления углевода и изменяя окраску окисляющего агента. Эти окислительно-восстановительные реакции используются как тесты на восстанавливающие сахара, т. е. на углеводы с незамещенным аномерным альдегидным атомом углерода.

Скорость мутаротации (разд. 2.2.2) значительно увеличивается в присутствии разбавленных щелочей и кислот, и равновесие между α - и β -D-глюкозой устанавливается очень быстро.

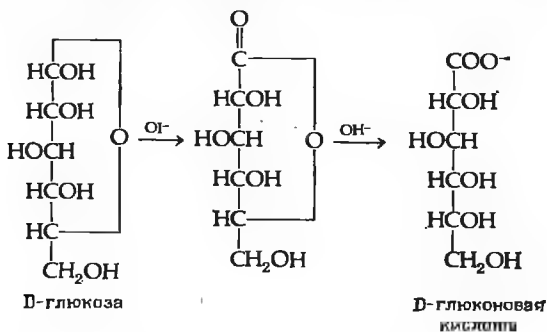
2.2.6.5. Восстановление моносахаридов

D-Глюкоза и L-сорбоза восстанавливаются газообразным водородом в присутствии подходящего металлического катализатора, образуя сорбит:



2.2.6.6. Окисление моносахаридов

Окисление моносахаридов до альдоновых и альдуроновых кислот возможно многими способами. D-Глюконовая кислота образуется в виде соли при взаимодействии D-глюкозы с гипохлоритами в щелочной среде. Эта реакция специфична для альдоз и используется для того, чтобы отличить их от кетоз:



2.3. Олигосахариды и полисахариды

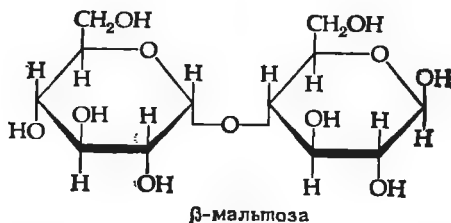
Гидролиз многих соединений приводит либо исключительно к моносахаридам, либо к их смеси с другими продуктами. В олиго- и полисахаридах моносахариды соединены гликозидными связями, образуя цепи различной длины — от дисахаридов (димеров) и трисахаридов (тримеров) до полисахаридов, содержащих до тысячи углеводных остатков. Олигосахариды [*oligo* (*греч.*) — немного] в отличие от полисахаридов дают при гидролизе сравнительно немного моносахаридных остатков. Различие между олигосахаридами и полисахаридами [*poly* (*греч.*) — много] условно, так как свойства высших олигосахаридов и низкомолекулярных полисахаридов совпадают. Соединения, содержащие 2—10 моносахаридных остатков, обычно называют олигосахаридами; соединения, содержащие более 10 остатков, — полисахаридами.

2.3.1. Олигосахариды

Общие характеристики олигосахаридов удобнее рассматривать на примере трех важных дисахаридов—мальтозы, лактозы и сахарозы. Мальтоза, как таковая, не встречается в природе в больших количествах; подобно другим олигосахаридам, она получается при частичном гидролизе более крупных молекул. Лактоза и сахароза встречаются в значительных количествах.

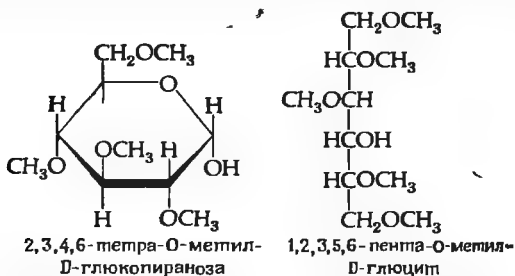
Мальтоза состоит из двух остатков глюкозы с гликозидной связью, соединяющей атом С-1 одного остатка и С-4 другого. Последний имеет незамещенный аномерный атом углерода с полуацетальной связью, так что мальтоза является восстанавливающим сахаром, вступающим в реакцию с карбонильными агентами:

она подвержена мутаротации.



Остаток с незамещенным аномерным атомом углерода называют восстанавливающим концом. Остаток, аномерный атом углерода которого участвует в образовании гликозидной связи, — невосстанавливающий конец. В мальтозе конфигурация гликозидной связи обозначается как α-1,4. Это показывает, что невосстанавливающий атом C-1 имеет α-конфигурацию и связан гликозидной связью с гидроксидной группой при C-4 другого углевода. Этот тип связи часто обозначается стрелкой, например α(1→4). Название мальтозы 4-О-α-D-глюкопиранозил-D-глюкопираноза или в соответствии с принятым для глюкозы сокращенным обозначением (см. список сокращений) D-Glc-(α1→4)-D-Glc.

Для определения структуры олигосахаридов используется ряд методов. На примере структуры мальтозы можно проиллюстрировать применение разнообразных подходов. Мальтоза дает положительную реакцию на восстанавливающий сахар, а при гидролизе — только глюкозу. Таким образом, по крайней мере один из двух остатков глюкозы содержит незамещенный аномерный атом углерода. При взаимодействии с боргидридом натрия (или водородом в присутствии подходящего катализатора) мальтоза восстанавливается по аномерному атому углерода до спирта. Восстановленное производное (альдит) было подвергнуто исчерпывающему метилированию метилиодидом в диметилсульфате, а затем гидролизу. Гидролизат содержит два метилированных углевода в эквивалентных количествах, которые могут быть идентифицированы сравнением с известными образцами. Ниже приводятся структурные формулы этих углеводов:



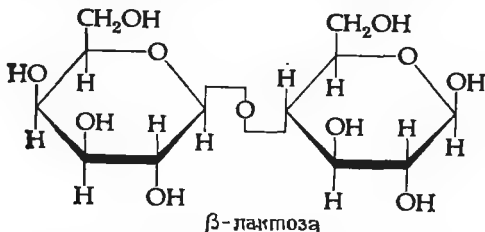
Один из них — 2,3,4,6-тетра-О-метил-D-глюкопираноза — образуется из невосстанавливающего конца, так как его аномерный углерод не замещен. Он не может образоваться из восстанавливающего конца, поскольку восстановление боргидридом превращает полуацетали в спирты. Структура этого продукта показывает также, что невосстанавливающий остаток имеет пиранозное кольцо. Другой продукт гидролиза — 1,2,3,5,6-пента-О-метил-D-глюцит, по-видимому, образуется

из восстанавливающего конца, так как гидроксидная группа при С-1 метилирована. Поскольку атом С-4 метилирован, гликозидная связь в мальтозе должна быть 1,4.

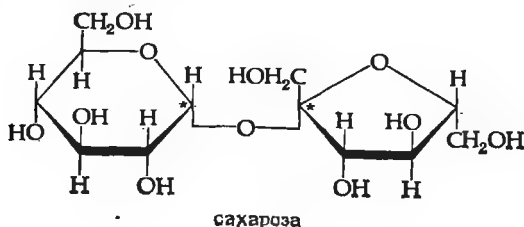
Исчерпывающее метилирование и гидролиз метилгликозида мальтозы дает эквимольные количества 2,3,4,6-тетра-О-метил- β -D-глюкопиранозы и 2,3,6-три-О-метил-D-глюкопиранозы. Это говорит о том, что восстанавливающий конец имеет пиранозное кольцо. Неизвестной остается только конфигурация гликозидной связи.

Легче всего определять конфигурацию гликозидной связи (α или β) с помощью ферментов с общим названием *гликозидазы*. Эти ферменты специфически гидролизуют гликозидные связи. Так, α -гликозидаза (*мальтаза*) гидролизует только α -гликозиды, а β -гликозидаза (*эмульсин*) гидролизует только β -гликозиды. Поскольку мальтоза гидролизует до глюкозы *мальтазой*, а не *эмульсином*, гликозидная связь в мальтозе имеет конфигурацию α .

Лактоза синтезируется только секреторными клетками желез млекопитающих в период лактации. Она присутствует в молоке в количестве от 2 до 6%; точное количество зависит от вида млекопитающего. Лактоза содержит эквимольные количества галактозы и глюкозы; систематическое название лактозы 4-О- β -D-галактопиранозил-D-глюкопираноза, или сокращенно β -Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc:



Сахарозу — широко известный пищевой продукт, именуемый в быту просто сахаром, — получают в промышленном масштабе из тростника или свеклы, хотя она встречается и во многих других растениях. В отличие от большинства других дисахаридов гликозидная связь сахарозы образована аномерными атомами углерода (помечены в формуле звездочками) моносахаридов глюкозы и фруктозы, входящих в ее состав. Поэтому сахароза — невосстанавливающий углевод; она не подвергается мутаротации и не обладает свойствами, которые определяются присутствием полуацетальной или полукетальной группы.



Полное название сахарозы α -D-глюкопиранозил- β -D-фруктофуранозид, или сокращенно D-Glc-(α 1 $\rightarrow$ 2)-D-Fru.

2.3.1.1. Гликозиды, содержащие неуглеводные остатки

В природе часто встречаются гликозиды, содержащие неуглеводные остатки и образующие при гидролизе сахар (или смесь сахаров) и спирт. Углеводная часть таких гликозидов называется *гликоном*, а неуглеводная — *агликоном*. Исходные гликозиды, как правило, лучше растворимы в воде, чем агликон, благодаря гидрофильной природе гликона.

В гликозидах растительного происхождения агликонами часто являются фенольные соединения, в том числе различные флавоны и антоцианы (из цветочных красителей), полифенол флоретин (во флоридзине, ядовитом гликозиде из корней многих фруктовых деревьев) и индоксил (в гликозиде, из которого готовится краситель индиго). Гликозиды очень многих соединений, в состав которых входит глюкуроновая кислота, синтезируются в организмах животных и обнаруживаются в моче; к таким соединениям относятся гликозиды, содержащие некоторые стероидные гормоны (гл. 44) и желчные пигменты (гл. 32).

2.3.2. Полисахариды

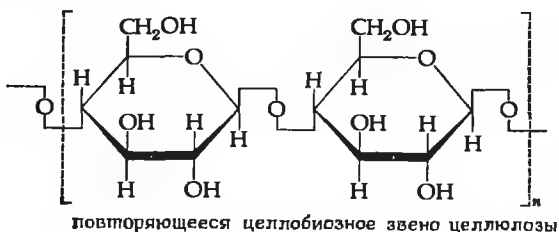
Подавляющее большинство углеводов в природе существует в форме высокомолекулярных соединений, которые при гидролизе дают моносахариды и (или) их простые производные. Наиболее часто встречающимся моносахаридным звеном полисахаридов является D-глюкоза. Но в качестве компонентов полисахаридов встречаются также D-манноза, D- и L-галактоза, D-ксилоза и L-арабиноза, D-глюкуроновая, D-галактуроновая и D-маннурановая кислоты, D-глюкозамин, D-галактозамин, сиаловые кислоты и аминокислоты. Полисахариды отличаются не только по своему моносахаридному составу, но и по молекулярной массе и структурным особенностям. Так, некоторые полисахариды — линейные полимеры, другие — сильно разветвлены. Во всех случаях моносахаридные звенья соединяются гликозидными связями, которые могут находиться в α - или β -форме и могут связывать соответствующие звенья по типу 1,2, 1,3, 1,4 или 1,6, образуя линейную или разветвленную полимерную структуру. Поэтому возможно огромное число вариантов этих структур. В самом деле, описано множество полисахаридов. Свойства трех гомополисахаридов — целлюлозы, крахмала и гликогена — иллюстрируют некоторые структурные особенности этого класса углеводов. Несколько важных гетерополисахаридов описываются в последующих главах.

2.3.2.1. Гомополисахариды

Целлюлоза. Несомненно, целлюлоза — наиболее распространенное органическое соединение, на долю которого у растительных организмов приходится 50% или более всего углерода. Хотя целлю-

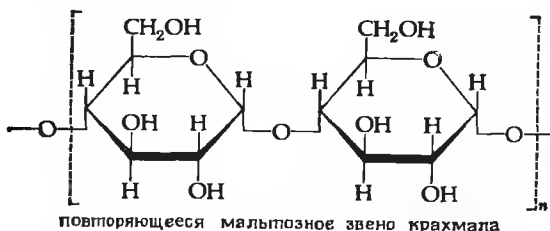
лоза — преимущественно растительный полисахарид, она найдена также у некоторых оболочников. Самый чистый источник целлюлозы, содержащий до 90% целлюлозы, — хлопок.

При полном гидролизе целлюлозы получается практически количественно глюкоза, частичный гидролиз дает дисахаридцеллобиозу. Гидролиз полностью метилированной целлюлозы почти количественно дает 2,3,6-три-О-метилглюкозу, указывая на отсутствие разветвлений. Отсюда и из других данных следует структурная формула для повторяющегося звена целлюлозной цепи, соединенной β -1,4-связями:



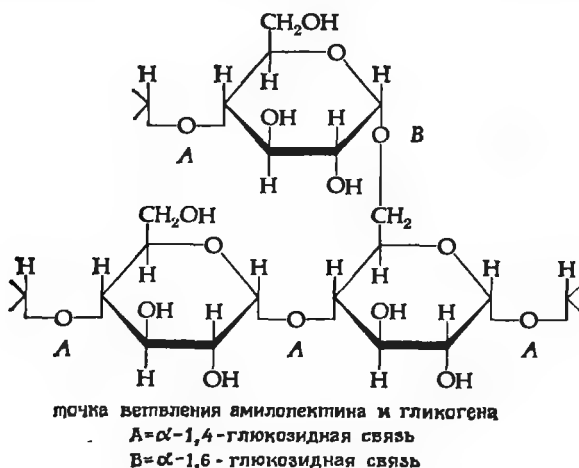
Целлюлоза нерастворима в воде, но растворяется в аммиачных растворах солей меди. Ее молекулярная масса, определенная для различных препаратов, находится между 50 000 и 400 000, что примерно соответствует содержанию 300—2500 остатков глюкозы в молекуле; эти данные могут быть занижены из-за деградации в процессе приготовления образца.

Крахмалы. В то время как в целлюлозе остатки глюкозы соединены β -1,4-связями, в крахмалах, которые служат питательным резервом в растениях, остатки соединены α -1,4-связями. Таким образом, повторяющимся дисахаридным звеном в крахмалах является мальтоза, а не целлобиоза:



Природные крахмалы представляют собой смесь двух типов соединений, которые можно отделить друг от друга. Одно из них — **амилоза**, как полагают, обладает длинной неразветвленной цепью

и в этом отношении аналогично целлюлозе. Другое — *амилопектин* — является полисахаридом с разветвленной цепью: одна концевая глюкоза встречается на каждые 24—30 остатков глюкозы. Остаток глюкозы, расположенный в каждой точке ветвления, замещен не только по положению С-4, но и С-6. Выделение из продуктов неполного гидролиза амилопектина α -1,6-дисахарида (*изомальтозы*) доказывает структуру в местах разветвления:



Степень разветвления больше в гликогене (см. ниже), чем в амилопектине. Амилопектин в отличие от гликогена может быть и не столь разветвленным и состоять из одной основной цепи с боковыми ветвями.

Различные препараты крахмала имеют молекулярные массы от 50 000 до нескольких миллионов. Учитывая вероятность некоторой деградации во время выделения, для нативных молекул крахмала более точны высокие значения.

Гликоген. Двойником крахмала в животном материале является *гликоген*, который встречается в значительных количествах в печени и мышцах и которого особенно много в моллюсках. Гликогенподобные полисахариды встречаются также в зернах злаков и бактериях.

Гликоген — полисахарид с разветвленной цепью, скорее напоминающий амилопектин, чем амилозу. Найдено, что гликоген содержит от 8 до 12 остатков глюкозы на одну невосстанавливающую концевую группу. Гликоген имеет молекулярную массу от 270 000 до 100 000 000. Даже в одном препарате наблюдается широкий разброс по размерам молекул.

Гликоген, встречающийся в животных клетках, имеет частицы гораздо меньшего размера, чем гранулы крахмала. Он легко диспергируется в воде с образованием опалесцирующих «растворов», которые дают красно-фиолетовую окраску с иодом. Гликоген относительно устойчив в горячих щелочах и осаждается из водных растворов добавлением этилового спирта.

α -1,4-Глюканмальтогидролаза частично гидролизует гликоген; как и в случае амилопектина, продуктом гидролиза является мальтоза. При полном кислотном гидролизе очищенный гликоген образует глюкозу с выходом, близким к теоретическому. Анализ ткани на гликоген обычно включает растворение ее в горячей щелочи, осаждение гликогена спиртом, кислотный гидролиз этого осадка и количественное определение образовавшейся глюкозы.

Гликоген также гидролизуются бактериальным ферментом *пуллулазой*, которая расщепляет α -1,6-связи этого полисахарида. Аналогичным образом фермент действует и на амилопектин.

Наиболее подробные сведения, касающиеся особенностей структуры крахмалов и гликогена, получены в основном путем расщепления этих молекул различными ферментами известной специфичности.

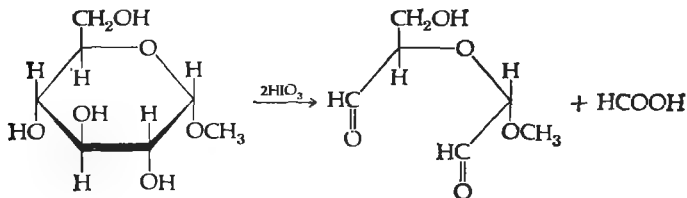
2.3.2.2. Анализ структуры полисахаридов

Молекулярные массы полисахаридов определяют несколькими методами, включая измерение осмотического давления, ультрацентрифугирование, измерение вязкости и светорассеяния. Эти же методы используют для определения молекулярных масс белков, как описано в гл. 5. Большинство полисахаридов *полидисперсны* и состоят из многих компонентов с различными молекулярными массами, даже когда они считаются чистыми по другим критериям. Образец «крахмала» может содержать молекулы, в которых присутствует от 100 до 10 000 остатков глюкозы, и все-таки они называются крахмалом.

Последовательность моносахаридных звеньев в полисахаридах и природа гликозидных связей устанавливаются методами, аналогичными описанным выше для мальтозы, хотя размер полисахарида и его полидисперсность часто усложняют структурный анализ. Исчерпывающее метилирование является ценным методом для определения не только числа остатков в неразветвленной цепи, но также типов гликозидных связей в разветвленных полисахаридах. Например, 10-членный неразветвленный полиглюкозид (α - или β -1,4) должен давать смесь 2,3,6-три-О-метилглюкозы и 2,3,4,6-тетра-О-метилглюкозы (9:1). Если молекула является разветвленной, должна образоваться ди-О-метилглюкоза; число ее остатков указывает на число точек ветвления, а положение метильных групп позволяет выявить гидроксидные группы в точках ветвления.

Иодная кислота — другой удобный реагент для изучения структуры полисахарида. Окисление углеводов этим реагентом в контролируемых условиях сопровождается количественным измерением расхода иодной кислоты и образования муравьиной кислоты. Гликоли расщепляются иодной кислотой с образованием двух альдегидов (расход периодата: 1 моль на 1 моль гликоля). Если в молекуле присутствует рядом три или более гидроксидных групп, то средний атом углерода освобождается в виде муравьиной кислоты, образуются два

альдегида и при этом расходуется 2 экв. периодата. Так, метил- α -D-глюкоза (α -метилгликозид) реагирует с иодной кислотой следующим образом:



Обработка иодной кислотой молекулы полисахарида, состоящего из повторяющихся звеньев гексозы, которые связаны линейно 1,4-гликозидными связями, привела бы к выделению 1 экв. муравьиной кислоты в результате окисления концевого остатка гексозы, образующего гликозидную связь. Дополнительно 2 экв. муравьиной кислоты образовались бы из восстанавливающего конца полисахаридной цепи, один из них в результате нормального окисления *цис*-гликольной группы, другой — из свободного альдегидного атома углевода. Число концевых групп в полисахариде, определенных этим методом, является показателем линейности (или разветвленности) полисахарида. Если на 1 моль полисахарида выход муравьиной кислоты превышает 3 моля, полисахарид должен содержать разветвленные цепи. Молярное отношение израсходованного периодата и образующегося формата указывает на степень разветвления.

Весьма перспективный подход к изучению структуры полисахарида включает в себя последовательное использование избирательно действующих ферментов, специфичность которых по типу гидролизующихся гликозидных связей хорошо изучена.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

- Brimacombe J. S., Webber J. M., *Mucopolysaccharides*, American Elsevier Publishing Company, Inc., New York, 1964.
- Davidson E. A., *Carbohydrate Chemistry*, Holt, Rinehart and Winston, New York, 1967.
- Florkin M., Stoltz E., *Comprehensive Biochemistry, Carbohydrates*, sec. II, vol. 5, American Elsevier Publishing Company, Inc., New York, 1963.
- Gottschalk A., *The Chemistry and Biology of Sialic Acids*, Cambridge University Press, New York, 1960.
- Jeanloz R. W., ed., *Chemistry of Amino Sugars*, vol. IA, Academic Press, Inc., New York, 1969.
- Jeanloz R. W., Balazs E. A., eds., *The Amino Sugars*, vol. IIA, Academic Press, Inc., New York, 1965.
- Pigman W. W., Horton D., eds., *The Carbohydrates: Chemistry/Biochemistry*, vols. IA, IIA, IIB, Academic Press, Inc., New York, 1972.
- Sharon N., *Complex Carbohydrates: Their Chemistry, Biosynthesis, and Functions*, Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Mass., 1975.
- Stacy M., Barker S. A., *Carbohydrates of Living Tissues*. D. Van Nostrand Company, Inc., Princeton, N. J., 1962.
- Whistler R. L., Wolffrom M. L., eds., *Methods in Carbohydrate Chemistry*, vol. I, Analysis and Preparation of Sugars; vol. IV, Starch; vol. V, General Polysaccharides; Academic Press, Inc., New York, 1962, 1964, 1965.

Обзорные статьи

- Bell D. J.*, Natural Monosaccharides and Oligosaccharides: Their Structure and Occurrence, in: M. Florkin, H. S. Mason, eds., Comparative Biochemistry, pp. 288—354, vol. III, pt. A, Academic Press, Inc., New York, 1962.
- Bentley R.*, Configurational and Conformational Aspects of Carbohydrate Biochemistry, *Annu. Rev. Biochem.*, **41**, 953—996, 1972.
- Ginsburg V., Neufeld E. F.*, Complex Heterosaccharides of Animals, *Annu. Rev. Biochem.*, **38**, 371—388, 1969.
- Heath E. C.*, Complex Polysaccharides, *Annu. Rev. Biochem.*, **40**, 29—56, 1971.
- Hirst E. L.*, The Structure of Polysaccharides, pp. 45—62, in: D. J. Bell, J. K. Grant, eds., The Structure and Biosynthesis of Macromolecules, Cambridge University Press, New York, 1962.
- Sharon N.*, Polysaccharides, *Annu. Rev. Biochem.*, **35**, 485—520, 1966.

Многие специальные вопросы химии углеводов рассмотрены в обзорах, опубликованных в *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Academic Press, Inc., New York (выход с 1945 г.).

Глава 3

ЛИПИДЫ

3.1. Классификация

Если животную или растительную ткань последовательно обрабатывать одним или несколькими *органическими растворителями*, например этанолом, эфиром, хлороформом, бензолом или петролейным эфиром, то некоторая часть материала перейдет в раствор. Компоненты такой растворимой фракции (вытяжки) называются липидами. Липидная фракция содержит вещества различных типов, которые могут быть классифицированы следующим образом:

- I. Жирные кислоты
- II. Глицеринсодержащие липиды
 - а) нейтральные жиры
 - 1) моно-, ди- и триацилглицерины
 - 2) простые эфиры глицерина
 - 3) гликозилглицериды
 - б) фосфоглицериды
 - 1) фосфатиды
 - 2) дифосфатидилглицериды и фосфоинозитиды
- III. Липиды, не содержащие глицерин
 - а) сфинголипиды
 - 1) церамиды
 - 2) сфингомиелины
 - 3) гликосфинголипиды
 - б) алифатические спирты и воска
 - в) терпены
 - г) стероиды
- IV. Липиды, связанные с веществами других классов
 - а) липопротеины
 - б) протеолипиды
 - в) фосфатидопептиды
 - г) липоаминокислоты
 - д) липополисахариды

Из-за гетерогенности входящих в липидную фракцию компонентов термин «липидная фракция» нельзя рассматривать как структурную характеристику; он является лишь рабочим лабораторным названием фракции, получаемой при экстракции биологи-

ческого материала малополярными растворителями. Однако большинство липидов имеет некоторые общие структурные особенности, обуславливающие их важные биологические свойства так же, как и сходную растворимость. В большинстве случаев они являются ионными или полярными производными углеводов и принадлежат к классу веществ, называемых *амфифилами* или *бифилами*. Амфифилы [*amphi* (греч.) — оба; *phyle* (греч.) — сродство] содержат полярные или ионные гидрофильные группировки, а также гидрофобные неполярные углеводородные группировки. Свойства амфифилов в значительной степени определяются природой этих группировок. Так, некоторые липиды, такие, как нейтральные жиры, очень слабо полярны и, как следствие, имеют очень низкое сродство к воде. Они хранятся в клетках, как правило, в безводном состоянии и служат энергетическими «резервуарами». Другие липиды, такие, как фосфоглицериды и сфинголипиды, более полярны; вследствие выраженных амфифильных свойств они являются основными структурными компонентами различных биологических мембран, служащих своеобразными «перегородками» в живой материи. Таким образом, рассмотрение структуры и свойств различных липидов очень важно для понимания их разнообразных биологических функций.

Липиды, входящие в классы I—III, рассмотрены в этой главе; соединения же, образующие IV класс, — в последующих разделах книги.

3.2. Жирные кислоты

В природе жирные кислоты в свободном виде встречаются редко. Однако, образуя *эфирные* или *амидные связи*, они входят в состав различных классов липидов, перечисленных выше, а также многих промежуточных продуктов метаболизма липидов. Целесообразно рассмотреть некоторые свойства жирных кислот, которые во многих отношениях сходны с другими амфифильными липидами. Биологически важные жирные кислоты характеризуются следующим: 1) являются, как правило, монокарбоновыми кислотами, содержащими одну ионизируемую карбоксильную группу и неполярную ациклическую неразветвленную углеводородную цепь; 2) обычно содержат четное число атомов углерода, хотя в природе встречаются также и жирные кислоты с нечетным числом углеродных атомов; 3) представляют собой либо насыщенные соединения, либо соединения с одной или несколькими двойными связями.

3.2.1. Насыщенные жирные кислоты

Общепринятые названия и формулы некоторых насыщенных жирных кислот приведены в табл. 3.1. При нумерации углеродных атомов первым считается углерод карбоксильной группы (C-1),

тогда как остальные атомы нумеруются по порядку так, что последним является углерод концевой метильной группы.

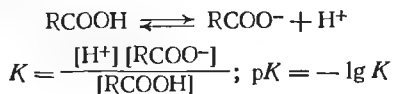
Таблица 3.1
Некоторые природные насыщенные жирные кислоты

Суммарная формула	Тривиальное название	Название по женевской номенклатуре	Структурная формула
$C_2H_4O_2$	Уксусная	Этановая	CH_3COOH
$C_3H_6O_2$	Пропионовая	Пропановая	CH_3CH_2COOH
$C_4H_8O_2$	<i>n</i> -Масляная	<i>n</i> -Бутановая	$CH_3(CH_2)_2COOH$
$C_6H_{12}O_2$	Капроновая	<i>n</i> -Гексановая	$CH_3(CH_2)_4COOH$
$C_8H_{16}O_2$	Каприловая	<i>n</i> -Октановая	$CH_3(CH_2)_6COOH$
$C_9H_{18}O_2$	Пеларгоновая	<i>n</i> -Нонановая	$CH_3(CH_2)_7COOH$
$C_{10}H_{20}O_2$	Каприновая	<i>n</i> -Декановая	$CH_3(CH_2)_8COOH$
$C_{12}H_{24}O_2$	Лауриновая	<i>n</i> -Додекановая	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$
$C_{14}H_{28}O_2$	Миристиновая	<i>n</i> -Тетрадекановая	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$
$C_{16}H_{32}O_2$	Пальмитиновая ^a	<i>n</i> -Гексадекановая	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$
$C_{18}H_{36}O_2$	Стеариновая ^a	<i>n</i> -Октадекановая	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$
$C_{20}H_{40}O_2$	Арахидовая	<i>n</i> -Эйкозановая	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$
$C_{22}H_{44}O_2$	Бегеновая	<i>n</i> -Докозановая	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$
$C_{24}H_{48}O_2$	Лигноцериновая	<i>n</i> -Тетракозановая	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$
$C_{26}H_{52}O_2$	Церотиновая	<i>n</i> -Гексакозановая	$CH_3(CH_2)_{24}COOH$
$C_{28}H_{56}O_2$	Монтановая	<i>n</i> -Октакозановая	$CH_3(CH_2)_{26}COOH$

^a Преобладает в животных липидах.

Температуры кипения и плавления жирных кислот возрастают с увеличением длины углеводородной цепи. Насыщенные жирные кислоты с четным числом углеродных атомов являются при комнатной температуре жидкостями, если общее число углеродных атомов меньше 10, или твердыми, если углеродная цепь более длинная.

Жирные кислоты являются слабыми кислотами и диссоциируют в водных растворах



Значения констант диссоциации для всех насыщенных жирных кислот очень близки между собой ($pK \approx 4,85$), а также соответствующей константе уксусной кислоты ($pK = 4,76$). Исключение составляет первый член этого ряда — муравьиная кислота ($pK = 3,75$). Таким образом, в водных растворах неионизированная

форма жирной кислоты (RCOOH) является преобладающей при $\text{pH} < \text{pK}$, тогда как ионизированная форма (RCOO^-) преобладает при $\text{pH} > \text{pK}$. Поведение слабых кислот в растворах более детально рассмотрено в разд. 4.2.1.

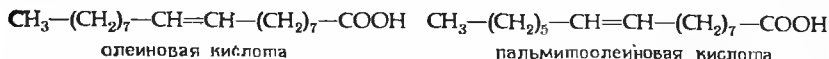
Смесь жирных кислот, получаемая при гидролизе липидов из различных природных источников, обычно содержит как насыщенные, так и ненасыщенные жирные кислоты. В типичных липидах животного происхождения преобладающей насыщенной жирной кислотой является пальмитиновая (C_{16}), второе место занимает стеариновая кислота (C_{18}). Более короткие жирные кислоты (C_{14} и C_{12}), так же как и более длинные (до C_{28}), встречаются лишь в небольших количествах. Жирные кислоты, содержащие 10 или меньше углеродных атомов, вообще редко встречаются в животных липидах.

3.2.2. Ненасыщенные жирные кислоты

Названия и структуры наиболее распространенных ненасыщенных жирных кислот приведены в табл. 3.2. В названиях этих соединений по женовской номенклатуре число углеродных атомов в молекуле указывается таким же способом, что и для соответствующих насыщенных кислот (с помощью греческих числительных), а число двойных связей — с помощью суффиксов («ен» — одна, «диен» — две, «триен» — три связи и т. д.). Положение двойной связи обозначается номером ближайшего к карбоксильной группе атома углерода, участвующего в образовании этой связи. Так, например, двойная связь в *цис*-9-гексадеценовой кислоте находится между девятым и десятым углеродными атомами, а двойные связи в *цис*-9,12-октадекадиеновой кислоте расположены между 9—10 и 12—13 атомами углерода.

Ненасыщенность жирных кислот *цис*-ряда существенно влияет на их свойства. Так, с увеличением числа двойных связей значительно снижается температура плавления жирных кислот, возрастает их растворимость в неполярных растворителях (табл. 3.3). Все обычные ненасыщенные жирные кислоты, встречающиеся в природе, при комнатной температуре — жидкости.

Одиночная двойная связь в жирных кислотах животного происхождения обычно находится в 9,10-положении. Двумя преобладающими мононенасыщенными жирными кислотами животных липидов являются олеиновая и пальмитоолеиновая.



олеиновая кислота

пальмитоолеиновая кислота

Олеиновая кислота является более широко распространенной в природе и превалирует в количественном отношении.

Таблица 3.2
Некоторые природные ненасыщенные жирные кислоты

Суммарная формула	Тривиальное название	Название в женевской номенклатуре ^б	Структурная формула
$C_{16}H_{30}O_2$	Пальмитоолеиновая ^а	9-Гексадеценовая	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7COOH$
$C_{18}H_{34}O_2$	Олеиновая ^а	<i>цис</i> -9-Октадеценовая	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$
$C_{18}H_{34}O_2$	Элаидиновая	<i>транс</i> -9-Октадеценовая	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$
$C_{18}H_{34}O_2$	Вакценовая	11-Октадеценовая	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_9COOH$
$C_{18}H_{32}O_2$	Линолевая ^а	<i>цис, цис</i> -9,12-Октадецидиеновая	$CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$
$C_{18}H_{30}O_2$	α -Линоленовая	9,12,15-Октадекатриеновая	$CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$
$C_{18}H_{30}O_2$	γ -Линоленовая	6,9,12-Октадекатриеновая	$CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_4COOH$
$C_{18}H_{30}O_2$	Элостеариновая	9,11,13-Октадекатриеновая	$CH_3(CH_2)_3CH=CH-CH=CH-CH=CH(CH_2)_7COOH$
$C_{20}H_{32}O_2$	Арахидоновая ^а	5,8,11,14-Эйкозатетраеновая	$CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_3COOH$
$C_{24}H_{46}O_2$	Нервоновая	<i>цис</i> -15-Тетракозеновая	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{13}COOH$

^а Приспособляет в животных липидах.

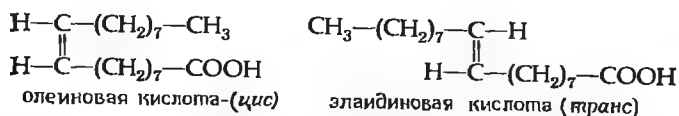
^б Все кислоты, кроме элаидиновой, обладают *цис*-конфигурацией.

Таблица 3.3

Некоторые свойства жирных кислот, содержащих 18 атомов углерода

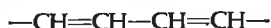
Кислота	Число двойных связей	Температура плавления, °С	Растворимость в холодном этаноле
Стеариновая	0	70	2,5%
Олеиновая	1	14	Неограниченна
Линолевая	2	5	»
Линоленовая	3	—11	»

Наличие двойной связи создает возможность образования *цис-транс*-изомеров. Известны изомерные формы 9-октадеценовой кислоты



Как правило, природные жирные кислоты с одной двойной связью принадлежат к *цис*-серии. Однако для других классов соединений это правило не всегда применимо.

Известно немало кислот, содержащих более одной двойной связи. Две двойные связи, расположенные в углеродном скелете следующим образом:

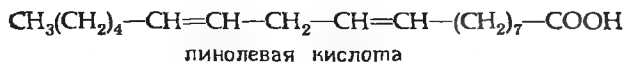


называются сопряженными (*конъюгированными*).

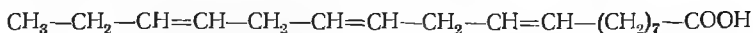
Конъюгированные двойные связи обнаружены в жирных кислотах растительного происхождения (элеостеариновая кислота, табл. 3.2), в то время как двойные связи в ненасыщенных жирных кислотах животных липидов обычно входят в дивинилметановую группировку



Наиболее часто встречающимися полиненасыщенными кислотами тканей млекопитающих являются линолевая кислота, содержащая две двойные связи

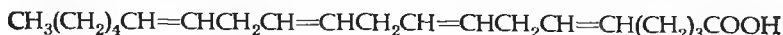


α -линоленовая с тремя двойными связями



α -линоленовая кислота

и арахидоновая кислота с четырьмя двойными связями



арахидоновая кислота

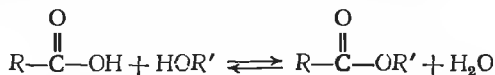
Линоленовая кислота и ее эфиры легко подвергаются окислению, что и определяет физические свойства высыхающих масел, например льняного масла, применяемого в производстве красок. Еще более ненасыщенные жирные кислоты содержат дополнительные двойные связи в районе между первым (карбоксильным) и девятым углеродными атомами. Примерами таких жирных кислот являются γ -линоленовая и арахидоновая кислоты (табл. 3.2), у которых чередование двойных и ординарных связей происходит по дивинилметановому типу.

Важную группу ненасыщенных жирных кислот составляют простагландины (гл. 19), образующиеся в ходе метаболизма преимущественно из арахидоновой кислоты. Поскольку простагландины обладают высокой физиологической активностью, становится очевидным большое значение их предшественников — некоторых полиненасыщенных жирных кислот.

3.2.3. Реакции жирных кислот

3.2.3.1. Этерификация

Этерификация — наиболее известная реакция с участием карбоксильной группы; в ходе этерификации молекула кислоты и молекула спирта обратимо реагируют с образованием одной молекулы эфира и воды



В отсутствие катализатора эта реакция протекает чрезвычайно медленно. Однако скорость ее возрастает с увеличением температуры или концентрации ионов водорода, а также при увеличении обоих этих параметров.

3.2.3.2. Реакции по двойным связям

Реакции по двойным связям жирных кислот включают присоединение водорода или галогена, а также окисление различными реагентами. Ненасыщенные жирные кислоты или их эфиры могут быть легко гидрированы газообразным водородом в присутствии катализаторов, например тонкоизмельченной платины, палладия или активированного никеля. Если восстановление осуществляется до

пользовать для разделения и количественного извлечения из смеси не только жирных кислот, но и некоторых их природных эфиров. Принципы хроматографического разделения детально рассмотрены в гл. 5.

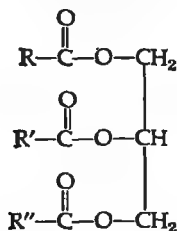
3.3. Липиды, содержащие глицерин

3.3.1. Нейтральные жиры

3.3.1.1. Моно-, ди- и триацилглицерины

Нейтральные жиры — наиболее распространенная в природе группа липидов. Эти соединения являются эфирами жирных кислот и глицерина $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$. Одна, две или три гидроксидные группы глицерина могут быть этерифицированы жирной кислотой с образованием моно-, ди- и триацилглицеринов соответственно. Термины «моно-, ди- и триглицериды» часто применяются для обозначения таких эфиров глицерина, однако они не являются химически строгими и не будут употребляться в данной книге. Триацилглицерины — наиболее распространенная форма нейтральных жиров, хотя моно- и диацилглицерины также встречаются в природе и играют важную роль в метаболизме липидов.

Общая формула триацилглицеринов



где R, R' и R'' — остатки одинаковых или разных жирных кислот, связанных с глицерином сложноэфирной связью. Номенклатура нейтральных жиров основывается на названиях жирных кислот, входящих в их состав. Так, например, тристеарин содержит в одной молекуле три остатка стеариновой кислоты, а олеодистеарин — один остаток олеиновой и два остатка стеариновой кислоты.

3.3.1.2. Физические и химические свойства

Нейтральные жиры являются слабыми амфифилами, поскольку эфирные связи, так же как и свободные гидроксидные группы в моно- и диацилглицеринах, не ионизированы и являются слабополярными. Таким образом, свойства этих веществ определяются главным образом наличием в их молекулах гидрофобных алкиль-

ных групп (см. введение понятия «амфифил» в разд. 3.1). Жиры нерастворимы в воде, но хорошо растворяются в неполярных растворителях. Чем жир богаче остатками короткоцепочечных и ненасыщенных жирных кислот, тем выше его растворимость и ниже температура плавления. Насыщение и увеличение длины цепей приводят к возрастанию температуры плавления; так, при комнатной температуре тристеарин представляет собой твердое вещество (т. пл. 71°C), тогда как триолеин (т. пл. -17°C) и трибутирин (т. пл. -75°C) — жидкости.

Таблица 3.4

Приблизительный состав смесей жирных кислот, выделенных из триацилглицеринов различного происхождения^a

Кислота	Относительное содержание, мол. %					
	Жировой запас				Жир печени коровы	Жир молока коровы
	человека	коровы	свины	овцы		
Масляная						9
Капроновая						3
Каприловая						2
Каприновая						4
Лауриновая						3
Миристиновая	3	7	1	2	3	11
Пальмитиновая	23	29	28	25	35	23
Стеариновая	6	21	10	26	5	9
Пальмитоолеиновая	5				10	4
Олеиновая	50	41	58	42	36	26
Линолевая	10	2	3	5	8	3
C ₂₀₋₂₂ -ненасыщенные					36	

^a Hilditch T. P., The Chemical Constitution of Natural Fats, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1940; см. также цитируемую в этой работе литературу.

^b Среднее число двойных связей на одну молекулу составляет 3,8.

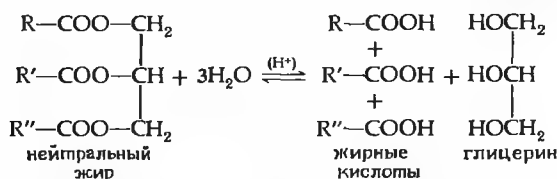
В табл. 3.4 приведены данные о составе нейтральных жиров из различных источников. Большинство животных жиров преимущественно содержит в различных соотношениях эфиры пальмитиновой, стеариновой, пальмитоолеиновой, олеиновой и линолевой кислот. Жиры из различных тканей одного и того же организма могут существенно различаться по составу. Так, подкожный жир человека более богат насыщенными жирными кислотами, чем жир печени, который в свою очередь содержит больше ненасыщенных жирных кислот. Жиры масла или молока по сравнению с другими жирами содержат наибольшее количество короткоцепочечных жирных кислот. Подкожные жиры различных млекопитающих существенно различаются по степени ненасыщенности остатков жирных кислот, о чем можно судить по разнице их температур плавления.

У говяжьего жира она довольно высока, а свиное сало плавится при гораздо более низкой температуре.

Растительные жиры (масла) также весьма разнообразны по составу жирных кислот, которые различаются как длиной углеводородных цепей, так и степенью их ненасыщенности. При комнатной температуре многие из них являются жидкостями.

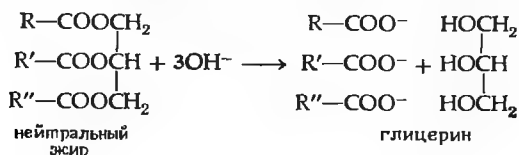
3.3.1.3. Гидролиз и омыление

В результате гидролиза нейтральных жиров образуются три молекулы жирной кислоты и одна молекула глицерина



Эта реакция протекает довольно медленно в кипящей воде, но значительно ускоряется каталитическими концентрациями H^+ или OH^- . В животных и растительных тканях эта реакция катализируется ферментами, называемыми *эстеразами* или, более точно, *липазами*.

Гидролиз нейтральных жиров щелочами (OH^-) называется *омылением*. Освобождающиеся в результате реакции карбоксилатные ионы ($\text{R}-\text{COO}^-$) в присутствии катионов образуют мыла

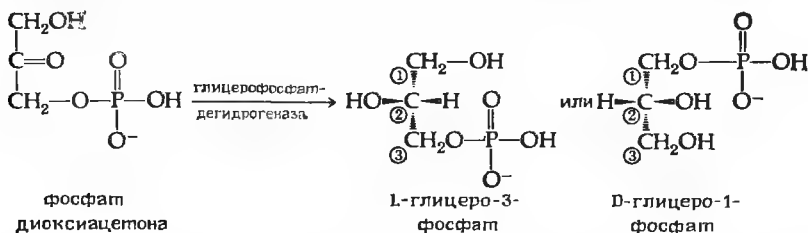


Реакция необратима; карбоксилатные ионы не вступают в реакцию рекомбинации с гидроксидными группами глицерина. Протеканию реакции омыления благоприятствует то, что первые порции образовавшегося мыла действуют как детергент. Конечные продукты реакции — мыла и глицерин — растворимы в воде и нерастворимы в неполярных растворителях, например в эфире. Это обстоятельство часто используется в химии липидов при разделении смеси веществ. *Омыляемая фракция* определяется как часть суммарного липида, которая после обработки горячей щелочью становится растворимой в воде и нерастворимой в эфире. Нейтральные жиры, таким образом, являются омыляемыми. В этой же главе будут приведены примеры неомыляемых веществ.

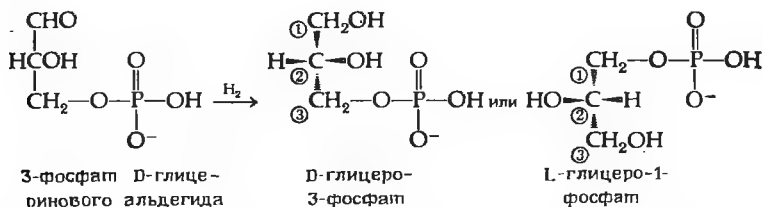
3.3.1.4. Глицерин и глицерофосфат

При комнатной температуре глицерин представляет собой сладкую вязкую жидкость, смешивающуюся с водой и спиртом, но нерастворимую в эфире. Он образует эфиры как с неорганическими, так и с органическими кислотами, и один из его фосфорных эфиров, *л*-глицеро-3-фосфат, является компонентом фосfogлицеридов, а также важным промежуточным продуктом метаболизма углеводов (гл. 14) и липидов (гл. 17).

Номенклатура глицерофосфатов часто затруднена тем, что существуют альтернативные способы обозначения положения фосфатной группы относительно асимметричного атома углерода. *л*-Глицеро-3-фосфат, образующийся в процессе метаболизма при действии фермента глицерофосфатдегидрогеназы (гл. 14), имеет единственный центр асимметрии у второго углеродного атома.

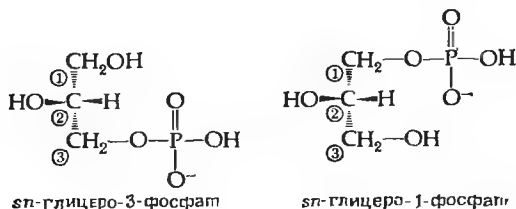


л-Глицеро-3-фосфат может быть назван также *д*-глицеро-1-фосфатом, которому он стереоспецифически идентичен. *д*-Глицеро-3-фосфат, являющийся энантимером *л*-глицеро-3-фосфата, образуется при каталитическом восстановлении 3-фосфата *д*-глицеринового альдегида и может быть назван также *л*-глицеро-1-фосфатом.



Неоднозначность и путаница, которые могут возникать из-за использования различных символов (*д* или *л*) для обозначения конфигурации одного и того же соединения, привели к необходимости использовать другую номенклатуру, которая основана на стереоспецифической нумерации атомов углерода, сокращенно обозначаемой приставкой *sn*. Так, *л*-глицеро-3-фосфат (*д*-глицеро-1-фосфат) запишется в этой номенклатуре как *sn*-глицеро-3-

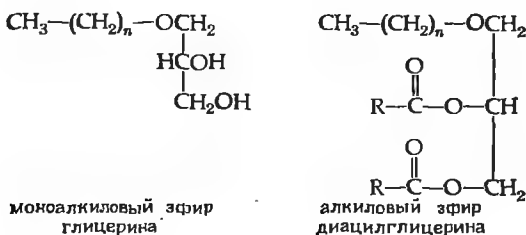
фосфат, а его энантиомер D-глицеро-3-фосфат (L-глицеро-1-фосфат) — как *sn*-глицеро-1-фосфат. Хотя эта номенклатура более четко отражает стереоспецифичность энантиомеров глицерофосфа-



тов, но в дальнейшем будет использоваться название L-глицеро-3-фосфат, а не *sn*-глицеро-3-фосфат, поскольку это соединение является основным природным глицерофосфатом, а его D-энантиомер встречается редко.

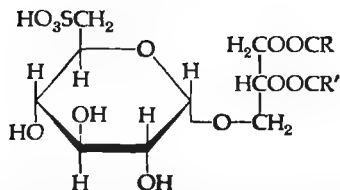
3.3.1.5. Простые эфиры глицерина и гликозилглицериды

Нейтральные липиды, называемые *алкиловыми эфирами глицерина*, были выделены из опухоли человека и бычьих эритроцитов. В этих соединениях длинноцепочечный (насыщенный или ненасыщенный) спирт и глицерин связаны простой эфирной связью



Имеющиеся данные позволяют предположить, что в природе эти липиды находятся не в свободном состоянии, а в виде этерифицированных производных длинноцепочечных жирных кислот, называемых *алкильными диацилглицеринами*.

Гликозилдиацилглицериды были выделены из растений и бактерий. Один из представителей липидов этого типа, выделенный из хлоропластов и хромофоров фотосинтезирующих бактерий, содержит 6-сульфо-6-дезоксиглюкозу (*хиновозу*), связанную гликозидной связью с диацилглицерином. Биологическая роль липидов этого типа еще не установлена.



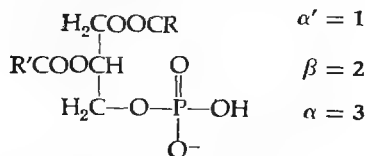
6-сульфо-6-дезоксi-α-глюкозилдиацилглицерин
(6-сульфохинозилдиацилглицерин)

3.3.2. Фосфоглицериды

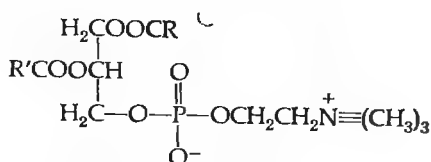
Эта группа глицеринсодержащих липидов включает производные 1-глицеро-3-фосфата. В основе их классификации лежит тип связи между углеводородной частью молекулы и глицерином, а также природа полярных групп (помимо фосфата) в молекуле. Биологическая роль этих амфифильных молекул весьма велика, так как именно они составляют до 50% всех липидов биологических мембран.

3.3.2.1. Фосфатиды

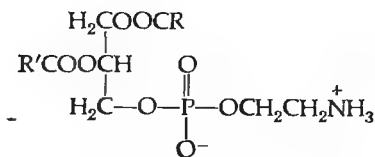
Фосфоглицериды широко распространены в растениях, животных и микроорганизмах и могут рассматриваться как производные 1-фосфатидной кислоты (1,2-О-диацил-1-глицеро-3-фосфата).



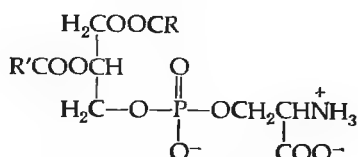
1-фосфатидная кислота



1-фосфатидилхолин



1-фосфатидилэтаноламин

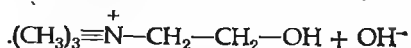


1-фосфатидилсерин

Среди соединений этой группы наиболее часто встречаются фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин, содержащие азотистое основание холин, этаноламин и серин соответственно. Фосфатидилхолины называют также *лецитинами*. У большинства природных фосфатидов насыщенные жирные кислоты

(C₁₆—C₁₈) находятся обычно в положении С-1, а ненасыщенные жирные кислоты (C₁₆—C₂₀), содержащие от одной до четырех двойных связей, — в положении С-2, хотя известны исключения из этого правила.

При физиологических значениях рН фосфатиды являются диполярными ионами и существуют преимущественно в виде ионных форм, изображенных выше. Таким образом, ионизированные группы образуют высокополярную гидрофильную часть молекулы, тогда как две ацильные группировки образуют ее гидрофобную часть. Функциональные группы этаноламина и серина имеют следующие значения рК: серин 9,15 (аминогруппа) и 2,25 (карбоксильная группа); этаноламин 9,5 (аминогруппа). Холин (гидроксид β-оксипропилтриметиламмония) является таким же сильным основанием, как КОН, и полностью диссоциирует в воде с образованием ионов холина и гидроксила

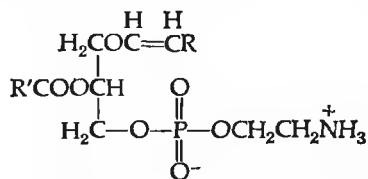


В водных растворах соли холина и сильных кислот, например, холинхлорид, ведут себя как нейтральные соединения.

При полном гидролизе 1 моля фосфатида (описанного выше типа) образуются 2 моля жирной кислоты и по 1 молю глицерина, фосфорной кислоты и азотсодержащего соединения. Известны ферменты, специфически катализирующие гидролиз определенных сложноэфирных связей в фосфатидилхолине. Так, *фосфолипаза А₁* из мозга гидролизует только сложноэфирную связь в положении 1, тогда как панкреатическая *фосфолипаза А₂* — сложноэфирную связь в положении 2. Удаление одного остатка жирной кислоты в положении С-1 или С-2 фосфатидилхолина (лецитина) приводит к образованию *лизофосфатидилхолина* (лизолецитина).

3.3.2.2. Плазмалогены

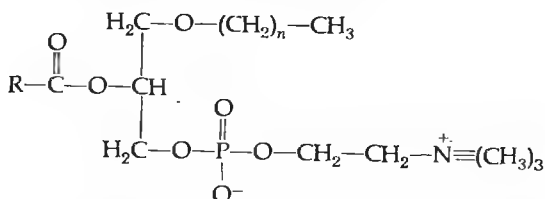
Эти фосфоглицериды содержат α,β-ненасыщенный спирт, образующий простую эфирную связь в положении С-1 1-глицеро-3-фосфата (в отличие от сложноэфирной связи, образуемой остатком жирной кислоты). Так, плазмалогены, содержащие этаноламин, имеют следующую структуру:



1-фосфатидальэтанолламин

Фосфатидальхолины, фосфатидальэтаноламины и фосфатидальсерины — три основных класса плазмалогенов. Простые эфирные связи α,β -ненасыщенных спиртов в этих соединениях стабильны в разбавленных щелочах, однако в разбавленных кислотах они гидролизуются с образованием альдегида соответствующего α,β -ненасыщенного спирта. α,β -Ненасыщенные спирты имеют *цис*-конфигурацию и длину цепи от C_{12} до C_{18} . В чистом фосфатидальхолине из бычьего сердца остаток жирной кислоты в положении С-2, как правило, является ненасыщенным, тогда как спиртовый остаток в С-1-положении является обычно насыщенным (исключение составляет лишь α,β -двойная связь). В тканях животных были обнаружены плазмалогены, не содержащие азотистых оснований, а также подобные триацилглицеринам нейтральные плазмалогены, содержащие две сложноэфирные связи и одну простую эфирную связь, образованную α,β -ненасыщенным спиртом в С-1-положении (1-алкенил-2,3-диацилглицерин).

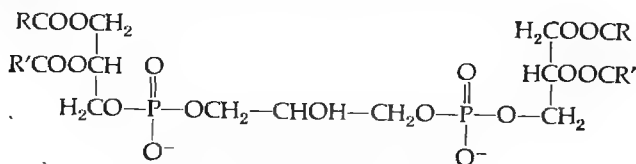
Производные 1-алкил-2-ацилфосфатидилхолина широко распространены в животных тканях. Эти соединения имеют общую формулу



Хотя содержание этих веществ в живых организмах составляет лишь несколько процентов общего количества фосфоглицеридов, они обнаружены в значительных количествах в эритроцитах, а в тканях некоторых беспозвоночных их содержание достигает 25% общего количества фосфоглицеридов.

3.3.2.3. Дифосфатидилглицерины

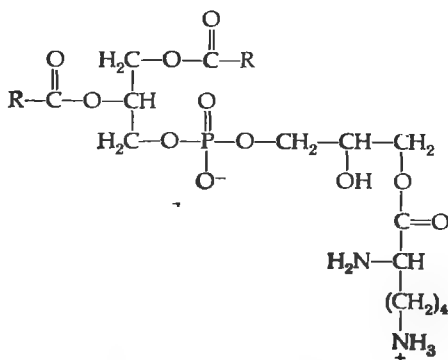
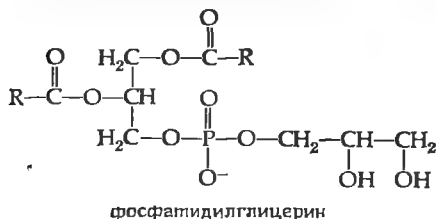
Как и следует из названия, дифосфатидилглицерины животных и растительных тканей содержат 1 моль глицерина и 2 моля γ -фосфатидной кислоты (на 1 моль дифосфатидилглицерина). Общая формула этих соединений показана ниже



дифосфатидилглицерин

3.3.2.5. Фосфатидилглицерин и его производные

Некоторые бактерии содержат значительное количество фосфатидилглицерина и его аминокислотного производного — L-лизилфосфатидилглицерина



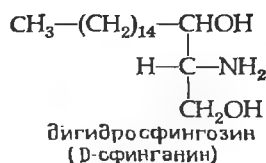
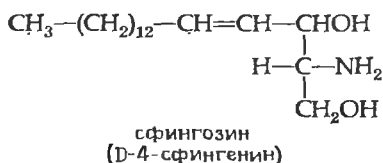
L-лизилфосфатидилглицерин

L-Аланилфосфатидилглицерин (содержащий L-аланин вместо L-лизина), является другим идентифицированным аминокислотным производным. Кроме этих производных был обнаружен также глюкозаминилфосфатидилглицерин, который содержит D-глюкозамин, образующий β-гликозидную связь с 2'- или 3'-гидроксидной группой глицеринового фрагмента фосфатидилглицерина.

3.4. Липиды, не содержащие глицерина

3.4.1. Сфинголипиды

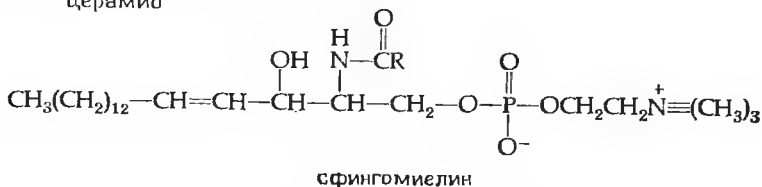
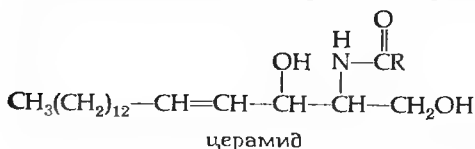
Большое число липидов может быть объединено в одну группу благодаря наличию в их структуре длинноцепочечного алифатического основания — *сфингозина* или *дигидросфингозина*



Такие липиды называются *сфинголипидами*. Хотя C_{18} -сфингозины являются наиболее распространенными среди природных сфинголипидов, встречаются также сфинголипиды, содержащие C_{16} -, C_{17} -, C_{19} - и C_{20} -сфингозины. Для двойной связи в сфингозинах характерна *транс*-конфигурация, а расположение заместителей у асимметрических атомов углерода C-2 или C-3 соответствует D-конфигурации.

3.4.1.1. Церамиды и сфингомиелины

Церамидами называют N-ацильные производные сфингозинов, в которых аминогруппа основания ацилирована жирной кислотой. Эти соединения широко распространены в тканях растений и животных, но количества их незначительны. Церамиды различаются остатками жирных кислот, входящими в их состав. Жирные кислоты, присоединенные амидными связями к аминогруппе основания в молекуле церамида, содержат различное число атомов углерода (C_{16} , C_{18} , C_{22} или C_{24}). Сфингомиелины могут рассматриваться как фосфохолиновые производные церамидов и являются одной из наиболее важных групп фосфолипидов.



Хотя сфингомиелины по химическому строению и отличаются от фосфатидилхолина, эти соединения проявляют определенное сходство, обусловленное типичной для амфифилов структурой, а именно наличием ионной фосфорилхолиновой группировки и двух длинных углеводородных цепей.

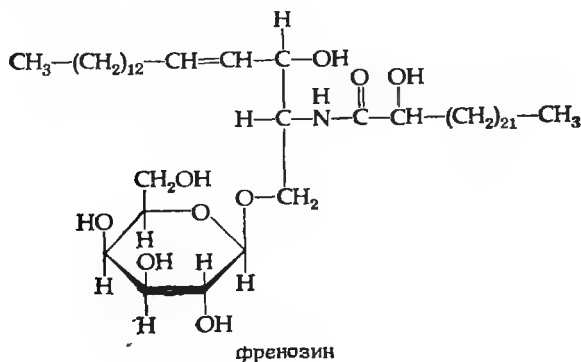
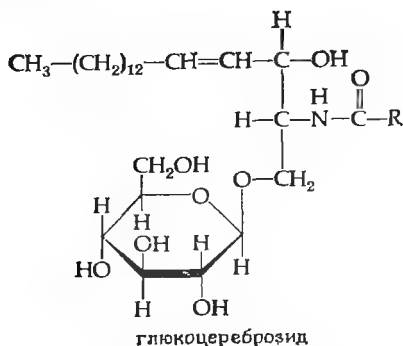
Впервые сфингомиелины были обнаружены в нервной ткани, однако они входят в состав липидов крови, а также встречаются во многих других тканях. Кроме обычных сфингозинов, рассмотренных выше, сфингомиелин из мозга содержит полиненасыщенные сфингозины, называемые *дегидросфингозинами*.

3.4.1.2. Гликосфинголипиды

Липиды нескольких классов, подобно сфингомиелинам, являются производными церамидов, однако они не содержат фосфора

и дополнительных азотистых оснований. В их состав входит один или несколько остатков углевода. Гликофинголипиды накапливаются в аномально больших количествах при некоторых заболеваниях, связанных с нарушениями липидного обмена (гл. 18). Гликофинголипиды подразделяются на три основных класса: цереброзиды, церамидолигосахариды и ганглиозиды.

Цереброзиды. Цереброзиды являются церамидмоносахаридами. Липиды этого класса в наибольших количествах содержатся в миелиновых оболочках нервов. При гидролизе 1 моля цереброзида образуется по 1 молю сфингозина, жирной кислоты и гексозы (наиболее часто β -галактозы, реже β -глюкозы). По этой причине представителей этой группы липидов часто называют *галактосфинголипидами* или *глюкосфинголипидами*. Кроме того, используют также термины *галактоцереброзиды* и *глюкоцереброзиды*. Остаток гексозы в молекулах цереброзидов присоединен β -гликозидной связью. Общая структурная формула глюкоцереброзидов, а также структурная формула галактоцереброзида *френозина* представлены ниже.



Цереброзиды содержат различные жирные кислоты, например, в состав френозина входит *цереброновая кислота*, являющаяся 2-оксикислотой.

Цереброзидсульфатиды (сульфаты цереброзидов). Сульфатсодержащие производные френозина встречаются в значительных количествах среди галактоцереброзидов белого вещества мозга. Серная кислота образует сложноэфирную связь с гидроксидной группой в С-3-положении остатка галактозы. Известны и другие сульфозефирные цереброзиды, называемые просто сульфатидами. Наличие отрицательно заряженной сульфогруппы увеличивает полярность этих амфифильных липидов.

Церамидолигосахариды. В состав молекул сфинголипидов этой группы входят гетероолигосахариды, связанные гликозидной связью с церамидом. Для обозначения этих соединений используются названия *церамиддисахарид*, *церамидтрисахарид* и т. д. В табл. 3.5 приведены некоторые церамидолигосахариды, струк-

Таблица 3.5
Некоторые церамидолигосахариды и ганглиозиды

Название	Структура
Лактозилцерамид (цитолипин Н)	$\text{Gal}(\beta 1 \rightarrow 4) \text{Glc-}\beta\text{-Cer}$
Галактозиллактозилцерамид	$\text{Gal}(\beta 1 \rightarrow 4) \text{Gal}(\beta 1 \rightarrow 4) \text{Glc-}\beta\text{-Cer}$
Церамидтетрасахарид (цитолипин К или глобозид)	$\text{GalNAc}(1 \rightarrow 6) \text{Gal}(1 \rightarrow 4) \text{Gal}(1 \rightarrow 4) \text{Glc-Cer}$
Гематозид	$\text{NeuAc}(2 \rightarrow 3) \text{Gal}(1 \rightarrow 4) \text{Glc-Cer}$
Ганглиозид G_{M2}	$\text{GalNAc}(1 \rightarrow 4) \text{Gal}(1 \rightarrow 4) \text{Glc-Cer}$ $\begin{array}{c} \text{3} \\ \uparrow \\ \text{2} \end{array}$ NeuAc
Ганглиозид G_{M4}	$\text{Gal}(1 \rightarrow 3) \text{GalNAc}(1 \rightarrow 4) \text{Gal}(1 \rightarrow 4) \text{Glc-Cer}$ $\begin{array}{c} \text{3} \\ \uparrow \\ \text{2} \end{array}$ NeuAc
Ганглиозид G_{D1a}	$\text{NeuAc}(2 \rightarrow 3) \text{Gal}(1 \rightarrow 3) \text{GalNAc}(1 \rightarrow 4) \text{Gal}(1 \rightarrow 4) \text{Glc-Cer}$ $\begin{array}{c} \text{3} \\ \uparrow \\ \text{2} \end{array}$ NeuAc

тура которых установлена. Церамиддисахарид, называемый *лактозилцерамидом* или *цитопилином Н*, при определенных условиях обладает иммунологической активностью.

Ганглиозиды. Эти сфинголипиды являются церамидолигосахаридами, содержащими помимо других сахаров по крайней мере один остаток сиаловой кислоты. Все ганглиозиды благодаря наличию карбоксильной группы в остатке N-ацетилнейраминовой кислоты являются кислыми соединениями. В табл. 3.5 приведены некоторые ганглиозиды, выделенные из тканей человека. Номенклатура и биосинтез этих соединений обсуждаются в гл. 18.

Как следует из названия этих соединений, ганглиозиды были впервые выделены из серого вещества мозга, однако они широко распространены и в других тканях.

3.4.2. Диольные липиды

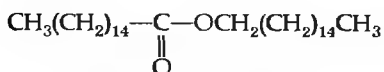
Хотя большинство липидов являются производными глицерина, в настоящее время известно, что все организмы — животные, растения или микроорганизмы — содержат по крайней мере в малых количествах липиды, которые являются производными диолов. В число таких диолов входят этиленгликоль, 1,2- и 1,3-пропандиолы, 1,3-, 1,4- и 2,3-бутандиолы, а также 1,5-пентандиол. Среди диольных липидов встречаются моно- и диацильные производные, являющиеся сложными эфирами различных жирных кислот, простые диэфиры, смешанные алкильные (или 1-алкенильные) и ацильные производные, диольные аналоги фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, диольный холинплазмалоген, ацилированные диольные галактозиды и диольные липоаминокислоты. Обычно содержание диольных липидов составляет только 0,5—1,5% от концентрации глицеринсодержащих липидов. Однако некоторые морские моллюски и иглокожие содержат примерно равное количество производных этиленгликоля и глицерина, особенно в конце лета или осенью. Поскольку содержание диольных липидов в тканях этих организмов уменьшается в течение зимы и весны, высказано предположение, что они могут использоваться как энергетический резерв. Нормальная крысиная печень содержит относительно мало диолов. На ранних стадиях регенерации печени они присутствуют в значительно больших количествах.

О биологической функции диольных липидов пока нет данных, если не считать упомянутой выше возможной роли этих соединений в качестве энергетического резерва у некоторых морских беспозвоночных. Предполагается также, что некоторые диолы замещают часть глицеринсодержащих липидов сходной структуры.

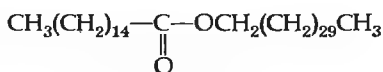
3.4.3. Алифатические спирты и воска

В некоторых липидных источниках были обнаружены значительные количества алифатических спиртов. Так, например, а фекалиях присутствует некоторое количество цетилового спирта $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{OH}$ — первичного спирта, соответствующего пальмитиновой кислоте.

Цетиловый спирт. В различных высокоспециализированных липидах спирты образуют сложные эфиры с жирными кислотами. Так, спермацет, получаемый из головного масла кашалотов, состоит главным образом из цетилпальмитата, а пчелиный воск очень богат мирицилпальмитатом.



цетилпальмитат

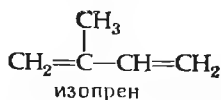


мирицилпальмитат

Общее название *воска* относится к природным эфирам жирных кислот и спиртов, отличных от глицерина. Воска являются главным липидным компонентом многих видов морского планктона — одного из основных источников пищи для океанской фауны.

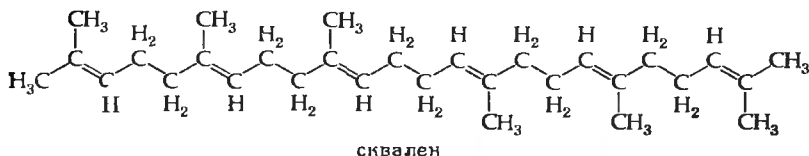
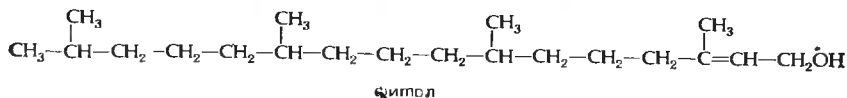
3.4.4. Терпены

В живой природе существует множество соединений, структура углеродного скелета которых сходна с изопреном (2-метилбутандиеном)

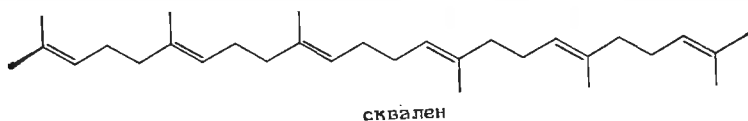


У многих из этих соединений число углеродных атомов кратно пяти, так что структуру каждого из них можно разбить на ряд фрагментов, сходных с изопреном. Соединения этого класса называются терпенами [*turpentine* (англ.) — скипидар]. К ним относятся эфирные масла, такие, как цитраль, пинен, гераниол, камфора, ментан; смоляные кислоты и каучук; различные растительные пигменты, в том числе каротины, ликопин и др., а также витамин А и сквален из животных тканей. Примерами терпенов с открытой цепью могут служить фитол — спирт, образующийся при гидролизе хлорофилла, и сквален — углеводород, являющийся главным компонентом секрета сальных желез, основным липидным

компонентом вируса дифтерии птиц, жира акульей печени, а также промежуточным продуктом в биосинтезе холестерина.

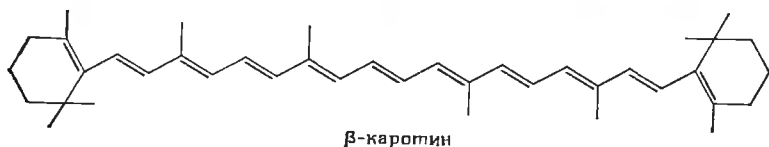


Используя сокращения, принятые в химии терпенов с открытой цепью, формулу сквалена можно изобразить следующим образом:

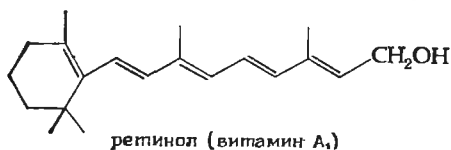


В этом случае атомы углерода и водорода не указываются, а метильные группы обозначаются как ответвления от основной цепи.

Особый интерес представляют каротиноиды — растительные пигменты. Структура β-каротина изображена ниже. Известны также α- и γ-каротины (гл. 51).



Как видно из формулы, молекула β-каротина симметрична. Значение этих соединений определяется тем, что каротины являются предшественниками витаминов группы А (гл. 51) и участвуют в фотосинтезе (гл. 16).

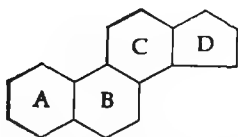


Благодаря наличию большого числа двойных связей в цепи оказывается возможным существование *цис-транс*-изомерных форм каротиноидов. Большая часть природных каротиноидов обладает полностью *транс*-конфигурацией, как это показано для витамина А₁. В природе встречается небольшое число каротиноидов, у которых одна или несколько двойных связей имеют *цис*-конфигурацию; кроме того, в животных тканях может осуществляться изомеризация. *цис*-Форма витамина А обнаружена в печени крысы, а каротиноид, содержащий одну двойную *цис*-связь, присутствует в зрительном пигменте глаза (гл. 40).

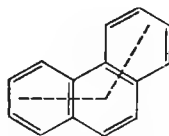
Некоторые другие соединения, являющиеся необходимыми компонентами пищи, также химически родственны терпенам. Так, вещества группы витамина Е (гл. 51) являются липидрастворимыми ароматическими соединениями, имеющими боковую цепь терпенового типа. Антигеморрагический фактор — витамин К (гл. 51), а также кофермент Q, функционирующий как переносчик электронов (гл. 12), — являются фитил-1,4-нафтохинонами.

3.4.5. Стероиды

Соединения этой большой группы имеют некоторое структурное сходство с терпенами. Разнообразие биологических свойств, присущих этим соединениям, сделало их одним из наиболее интересных и вследствие этого наиболее изученных классов веществ биологического происхождения. Соединения этой группы могут рассматриваться как производные восстановленных конденсированных циклических систем — циклопентанофенантронов, состоящих из трех конденсированных циклогексановых колец (А, В и С) в нелинейном или фенантреновом сочленении и цикlopentanового кольца (D).



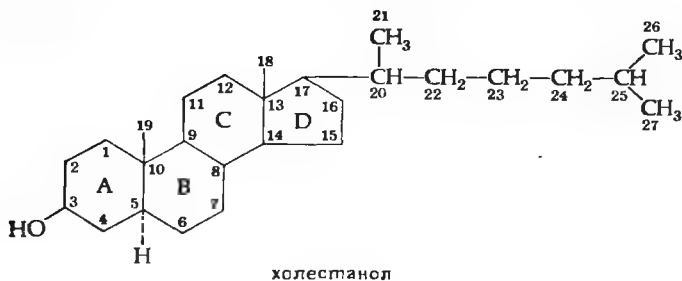
пергидроциклопентанфенантрен



фенантрен

Некоторые общие характеристики этих соединений могут быть рассмотрены на примере типичного представителя этой группы веществ — холестерина. Удобный способ нумерации углеродных ато-

мов показан в приведенной ниже структурной формуле холестерина



Следует отметить, что все циклы в молекуле являются насыщенными. В используемой системе сокращенного обозначения положение двойных связей указывается особо.

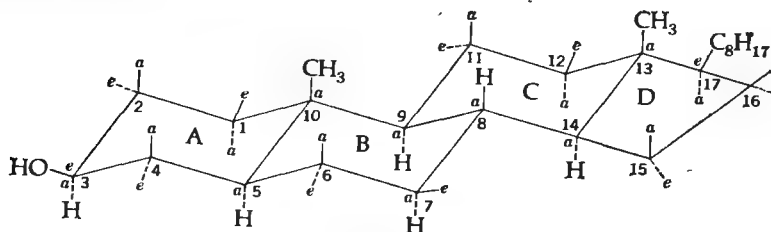
3.4.5.1. Общая характеристика

Некоторые общие положения могут быть высказаны в связи с приведенной выше структурной формулой. Присутствие кислородсодержащего заместителя у атома С-3 является характерной особенностью почти всех природных стероидов. Другой характерной особенностью является наличие «ангулярных» метильных групп 19 и 18, связанных с углеродными атомами 10 и 13. Однако, как будет показано ниже, у эстрогенов кольцо А является ароматическим, поэтому углеродный атом 10 не может быть связан с метильной группой. У углеродного атома 17 часто имеется алифатический заместитель. Структура этого заместителя является удобным критерием для классификации; таким образом, стероиды могут быть объединены в группы в соответствии с числом углеродных атомов в боковой цепи. Боковая цепь у стероидов содержит 8, 9 или 10 углеродных атомов (общее число атомов углерода 27, 28 или 29 соответственно), у желчных кислот — 5 углеродных атомов (общее число атомов углерода 24), у адренокортикостероидов и прогестерона — 2 (общее число атомов углерода 21). В природных эстрогенах и андрогенах (общее число атомов углерода 18 или 19) вообще отсутствует боковая цепь.

3.4.5.2. Основы стереохимии и конформационного анализа

Из конформационной формулы холестерина следует, что молекула является жесткой. Буквами *a* и *e* обозначены аксиальные и экваториальные заместители соответственно. Не все атомы водорода указаны в формуле, некоторые из них обозначены сплошными или пунктирными линиями. Для самого циклогексана конформация кресла является более устойчивой, чем конформация ванны. В мо-

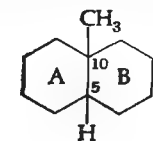
лекуле холестерина кольца В и С жестко зафиксированы в конформации кресла благодаря *транс*-конденсации с кольцами А и D. Кольцо А может принять конформацию ванны, однако нестабильность такой формы, присущая самому циклогексану, возрастала бы в результате сильного взаимодействия метильной и гидроксидной групп, находящихся в «носовом» (С-10) и «кормовом» (С-3) положениях ванны.



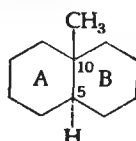
конформационная структура холестерина

В молекуле холестерина имеется девять центров асимметрии, которые находятся у 3, 5, 8, 9, 10, 13, 14, 17 и 20-го углеродных атомов. При написании структурных формул стероидов заместители, имеющие β -ориентацию (обращенные вперед), обозначаются сплошной линией, а имеющие α -ориентацию (обращенные назад) пунктирной линией. Так, углеродные метильные группы у атомов С-10 и С-13 имеют β -ориентацию, так же как и 3-гидроксидная группа, водород у атома С-8 и боковая цепь у атома С-17.

Относительно положений двух центров асимметрии следует сделать дополнительные замечания. Атом водорода у атома С-5 может располагаться либо на той же стороне (относительно плоскости молекулы), что и метильная группа у С-10, либо на противоположной стороне. В первом случае кольца А и В находятся в *цис*-ориентации относительно друг друга и в этом случае говорят, что молекула имеет *нормальную* конфигурацию. Если же протон и метильная группа находятся на противоположных сторонах, а кольца А и В находятся в *транс*-ориентации, то молекула имеет *алло*-конфигурацию.

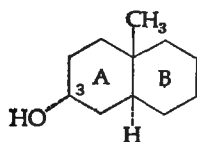


А/В *цис*-нормальная

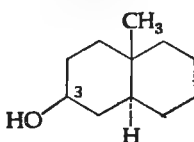


А/В *транс*-алло

Гидроксидная группа у С-3 также может находиться в α - и β -ориентации.



α , алло



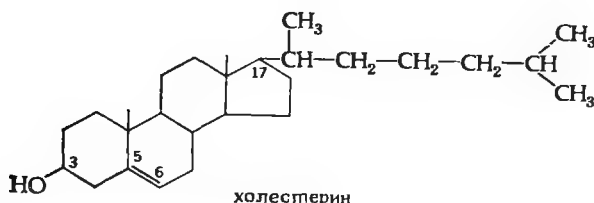
β , алло

Стероиды, содержащие 3β -гидроксидную группу, осаждаются дигитонином, который сам является гликозидом стероида. Многие аналитические методы оп-

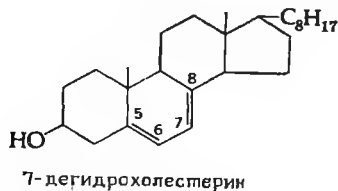
ределения холестерина основаны на осаждении его дигитонином. Высокая специфичность реагента позволяет использовать его для определения конфигурации других стероидов.

3.4.5.3. Стерины

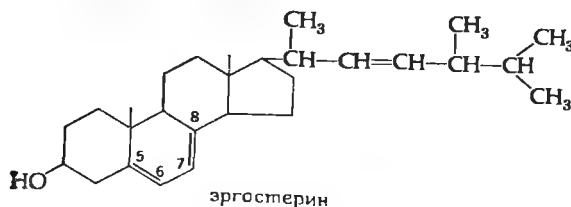
Стероиды, имеющие от 8 до 10 углеродных атомов в боковой цепи, находящейся в положении 17, и спиртовую гидроксидную группу в положении 3 (объединяются в отдельный класс, называемый *стеринами*. В животных тканях наиболее распространенным представителем стерина является холестерин.



Кроме β -гидроксидной группы в положении 3 в этом соединении имеется одна двойная связь в 5,6-положении. Холестерин присутствует почти во всех животных липидах, а также в крови и желчи. В крови только одна треть холестерина существует в виде свободного спирта, тогда как две трети его этерифицировано главным образом ненасыщенными жирными кислотами (гл. 17). Восстановление двойной связи приводит к образованию двух продуктов — копростанола (β , нормальная конфигурация) и холестанола (β , *алло*), которые также встречаются в природе. Первый из них является основным стеринном фекалий, тогда как второй является минорным стеринном крови и некоторых тканей. 7-Дегидрохолестерин, образующийся при окислении холестерина, содержит пару конъюгированных двойных связей. Этот стерин обнаружен в коже (гл. 18 и 51).



Такое же расположение двойных связей характерно и для дрожжевого стерина — эргостерина,



который, как и ряд других растительных стерinov, имеет 8 углеродных атомов и одну двойную связь в боковой цепи. Ультрафиолетовое облучение обоих этих соединений вызывает разрыв кольца В, что приводит к образованию продуктов, обладающих активностью витамина D (гл. 51).

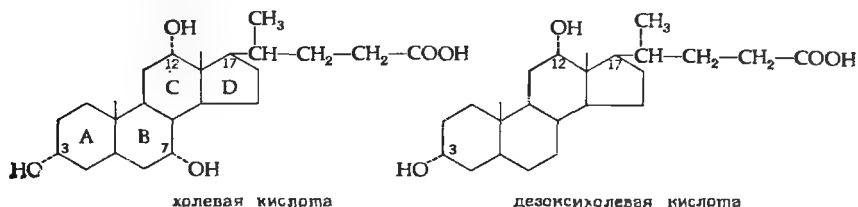
Другой тип биологически важных стерinov представлен ланостерином, впервые обнаруженном в липидах шерсти

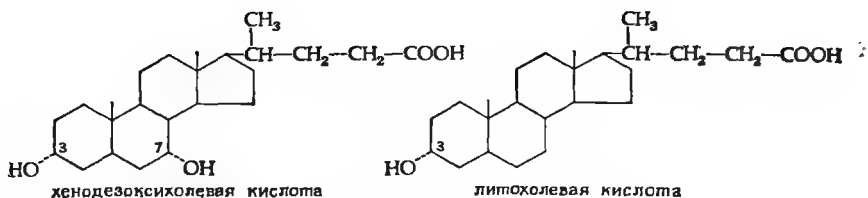


Отличительной структурной особенностью этого стерина является наличие *гем* (двойного)-диметильного заместителя у атома С-4 и ангулярной метильной группы у С-14. Одна из двойных связей находится в боковой цепи в 24,25-положении, а вторая — в ядре молекулы в 8,9-положении. Ланостерин является промежуточным продуктом биосинтеза холестерина (гл. 18).

3.4.5.4. Желчные кислоты: C_{24} -стероиды

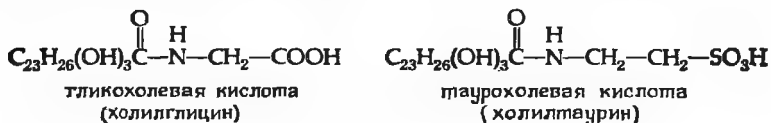
В желчных кислотах боковая цепь у С-17 состоит из пяти углеродных атомов и оканчивается карбоксильной группой. Четыре такие кислоты выделены из желчи человека.





В этих соединениях все гидроксидные группы имеют α -конфигурацию, а А и В кольца — *цис*- или нормальную конфигурацию. В желчи человека преобладающей желчной кислотой является холевая кислота (3 α ,7 α ,12 α -триоксихолановая кислота), хотя обнаружены значительные различия в соотношении желчных кислот.

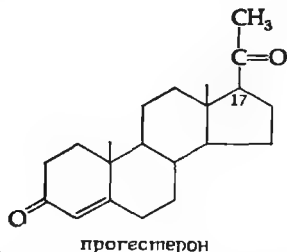
В желчи эти кислоты обычно связаны амидными связями с аминокислотами — глицином и таурином, как, например, в гликохолевой и таурохолевой кислотах.



Соли этих конъюгированных кислот растворимы в воде и являются эффективными детергентами.

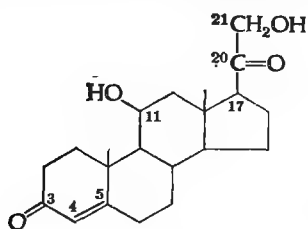
3.4.5.5. Прогестерон и адренокортикостероиды: C_{24} -стероиды

Поскольку стероиды, имеющие важное эндокринологическое значение, подробно рассмотрены в части пятой, остановимся здесь лишь на некоторых химических особенностях этих соединений. К числу стероидов, содержащих два углеродных атома в боковой цепи у атома С-17, относится прогестерон, продуцируемый желтым телом яичников.

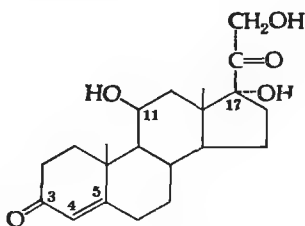


Много стероидов выделено из коры надпочечников. В принятой номенклатуре за исходное соединение принят кортикостерон. Сре-

ди различных физиологически активных производных этой молекулы, обнаруженных в коре надпочечников, следует отметить 17-оксикортикостерон, называемый кортизолом



кортикостерон



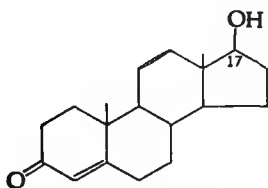
кортизол (17-оксикортикостерон)

Важными структурными характеристиками этих соединений являются: наличие сопряженных двойных связей у атомов C-3, C-4 и C-5, образующих так называемую структуру α,β -ненасыщенного кетона; наличие гидроксидной группы в положении 11 и, наконец, состояние окисления углеродных атомов боковой цепи (C-20 и C-21).

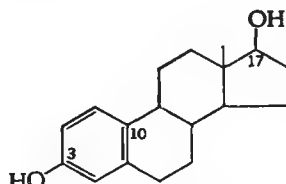
3.4.5.6. Андрогены и эстрогены: C₁₉- и C₁₈-стероиды

Андрогены, или мужские половые гормоны, являются C₁₉-стероидами и принадлежат к классу стероидов, не имеющих боковой цепи в положении 17. Примером может служить тестостерон, синтезируемый в семенниках.

Эстрогены отличаются от рассмотренных выше стероидов тем, что кольцо А в этом случае является ароматическим. Таким образом, в положении 10 молекулы нет свободной валентности для присутствия метильной группы, а гидроксидная группа в положении 3 является по своей природе скорее фенольной, чем спиртовой. Благодаря этому эстрогены ведут себя как слабые кислоты и могут быть экстрагированы из бензольных растворов водными щелочами. Эстроген, секретируемый яичниками, представляет собой эстрадиол-17 β

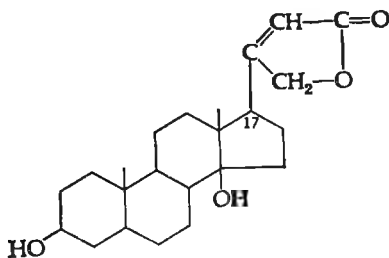


тестостерон

эстрадиол-17 β

3.4.5.7. Смешанные стероиды

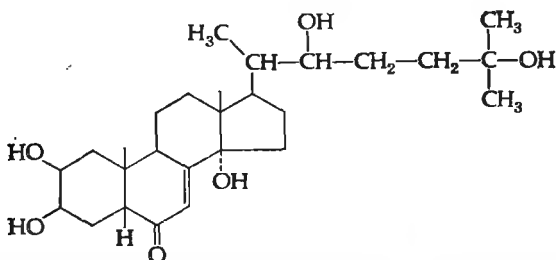
Кроме рассмотренных выше к числу стероидов относится также ряд других интересных соединений. Среди них стимулирующие сердечную деятельность гликозиды, лекарственные препараты которых получают из наперстянки, морского лука и других растений. При гидролизе таких гликозидов образуется сахар и стероидный агликон, например дигитоксигенин



дигитоксигенин

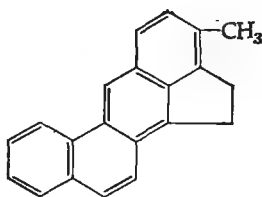
Отличительной структурной особенностью соединений этой группы является наличие кольца γ -лактона в положении 17. Сапогенины — агликоны растительного происхождения — так же как и некоторые токсины жаб, являются стероидами. Соединение, в состав которого входят сапогенин и сахар, называется *сапогином*. Все сапонины являются поверхностно-активными веществами, а также эффективными лизирующими агентами.

Стероидный гормон насекомых, влияющий на процессы линьки и метаморфоза, называется *экдизоном*



экдизон

Ароматические соединения, близкие по структуре к стероидам, часто обладают канцерогенной активностью. Метилхолантрени является сильнодействующим канцерогеном такого рода.



метилхолантрени

3.5. Липиды как амфифилы: мицеллы и бислои

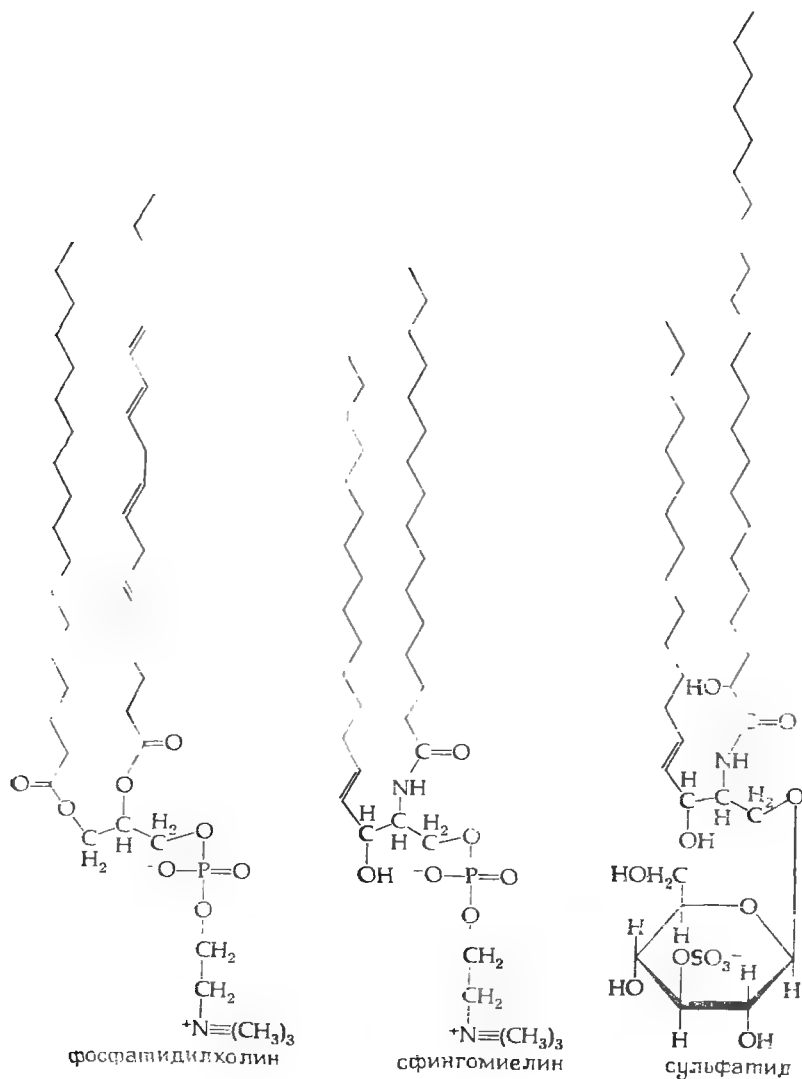
Липиды не образуют макромолекул, аналогичных белкам, полисахаридам или нуклеиновым кислотам — полимерам, образованным ковалентно связанными повторяющимися структурными единицами: аминокислотами, моносахаридами и нуклеотидами соответственно. Однако благодаря своей амфифильности липиды способны образовывать высокоорганизованные структуры, соизмеримые с макромолекулами. Вместе с белками такие структуры образуют биологические мембраны, которые окружают все клетки и служат своеобразными перегородками между ними.

Молекулы липидов, как и всех амфифилов, имеют вытянутую форму, обусловленную наличием длинных углеводородных цепей, отходящих от полярных группировок. Такая геометрия молекул становится понятной, если посмотреть на приведенные ниже структурные формулы.

Полярная или ионная группа молекулы липида называется *головкой*, а неполярная углеводородная цепь — *хвостом*. Различия во взаимодействиях головок и хвостов с водой главным образом и определяют амфифильные свойства липидов. Головка липида является гидрофильной и хорошо растворима в воде. Полярная головка, например фосфатидилхолина, упорядочивает молекулы воды в своем непосредственном окружении в результате образования водородных связей или ион-дипольных взаимодействий между ионизированными группами или полярными атомами и молекулами воды. В спирте или эфире такие взаимодействия очень слабы или вообще отсутствуют. Поэтому фосфатидилхолин растворим в воде и практически нерастворим в спирте и эфире.

Напротив, простые углеводороды с длинной цепью, соответствующей длине хвостов липидных молекул, являются гидрофобными. В водных средах они не могут окружить себя ориентированными молекулами воды подобно полярной головке и, следовательно, нерастворимы в воде. Растворимость липидов в воде определяется суммой взаимодействий полярных головок и неполярных хвостов с молекулами воды. Введение в состав полярной головки одной или двух метильных групп не влияет существенно на растворимость, тогда как увеличение длины углеводородных хвостов вызывает заметное снижение растворимости.

Растворимость солей длинноцепочечных жирных кислот (мыл) и *сурфактантов* (детергентов), таких, как, например додецилсульфат натрия, является хорошим примером, демонстрирующим связь особенностей структуры и поведения амфифилов (в том числе сложных липидов) в водных средах. Калиевые и натриевые соли жирных кислот и додецилсульфат натрия до некоторой степени растворимы в воде; соли же двухзарядных и трехзарядных ионов металлов, например Ca^{2+} или Fe^{3+} , совсем нерастворимы. Калие-



вые соли более растворимы, чем натриевые, а соли ненасыщенных жирных кислот несколько более растворимы, чем соли насыщенных кислот. Как схематически показано на рис. 3.1, при введении небольшого количества сурфактанта или мыла в водную фазу некоторая его часть переходит в раствор в виде мономеров, тогда как другая часть образует монослой на границе раздела вода — воздух, причем в этом случае полярные головки молекул погружены

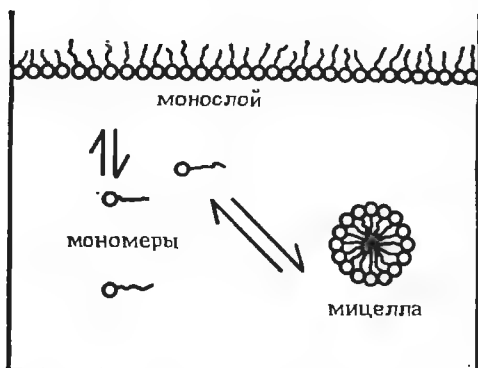


Рис. 3.1. Схематическое изображение структур, образуемых сурфактантами в водной среде. Существует равновесие между молекулами сурфактантов, находящимися в виде мономеров и образующих мицеллы и монослой на границе раздела фаз. Мицеллы имеют форму глобул; на рисунке они изображены в поперечном сечении, что позволяет видеть относительное расположение полярных групп (кружочки) и жирных боковых цепей («хвосты»).

в воду, а углеводородные цепи выносятся из водной фазы. Между молекулами, находящимися в растворе и образующими монослой на границе раздела фаз, существует динамическое равновесие. Поверхностное натяжение воды на такой границе раздела фаз уменьшается, поскольку силы притяжения между молекулами воды ослабевают из-за присутствия углеводородных цепей. Если увеличить количество добавленного в водную фазу сурфактанта, то концентрация растворимых мономеров будет возрастать до определенного предела, называемого критической концентрацией, после чего молекулы сурфактанта начнут ассоциировать друг с другом, образуя *мицеллы*. Мицеллы являются стабильными коллоидными агрегатами, которые образуются амфифилами при концентрациях, превышающих определенную узкую область концентраций, называемую *критической концентрацией мицеллообразования* (ККМ). Амфифилы характеризуются различными значениями ККМ.

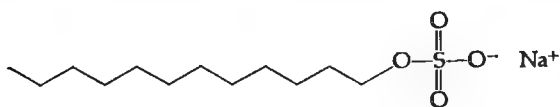
Движущими силами при образовании мицелл являются гидрофобные взаимодействия, так как неполярные части молекул не могут разорвать водородные связи между молекулами воды и, как следствие, переходят в тесный контакт друг с другом. Таким образом внутренняя зона мицеллы состоит из гидрофобных хвостов, образующих как бы «капельку» жидкого углеводорода. Гидрофобная зона отделена от водной фазы полярными группами молекул, которые покрывают поверхность мицеллы. Эффективность detergentного действия сурфактантов определяется в значительной сте-

Таблица 3.6
Некоторые свойства обычно употребляемых сурфактантов

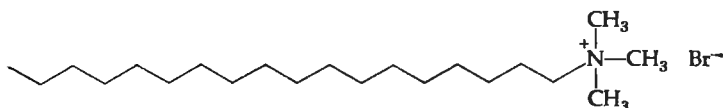
Сурфактант	Число молекул в мицелле	Мол. масса мицелл	ККМ, ммоль/л	Условия
Додецилсульфат натрия	62 126	18 000 36 000	8,2 0,52	Вода 0,5 М NaCl
Бромид цетилтриметил- аммония	169	62 000		0,013 М KBr
Тритон-X-100	140	90 000	0,24	Вода

пени их способностью переводить в раствор в гидрофобной зоне мицелл липидрастворимые вещества.

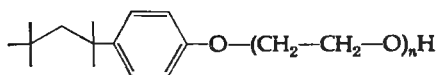
В табл. 3.6 приведены некоторые параметры мицелл, образованных анионным сурфактантом *додецилсульфатом натрия*, катионным сурфактантом *бромидом цетилтриметиламмония* и нейтральным сурфактантом *тритоном-X-100*. ККМ, число молекул сурфактанта в мицеллах, а также размер и форма последних зависят как от структуры сурфактанта, так и от состава водной среды.



додецилсульфат натрия



цетилтриметиламмонийбромид



ряд тритона X

Амфифильные свойства биологических липидов, таких, как фосфатиды, гликолипиды и сфинголипиды, являющихся главными липидными компонентами биомембран, имеют ряд существенных отличий от свойств сурфактантов. Так, если растворить в воде чрезвычайно малое количество фосфатида, то число молекул, присутствующих в виде мономеров, оказывается очень небольшим, а образование мицелл может происходить даже при столь низких концентрациях, как 10^{-10} моль/л. Например, ККМ для дипальми-

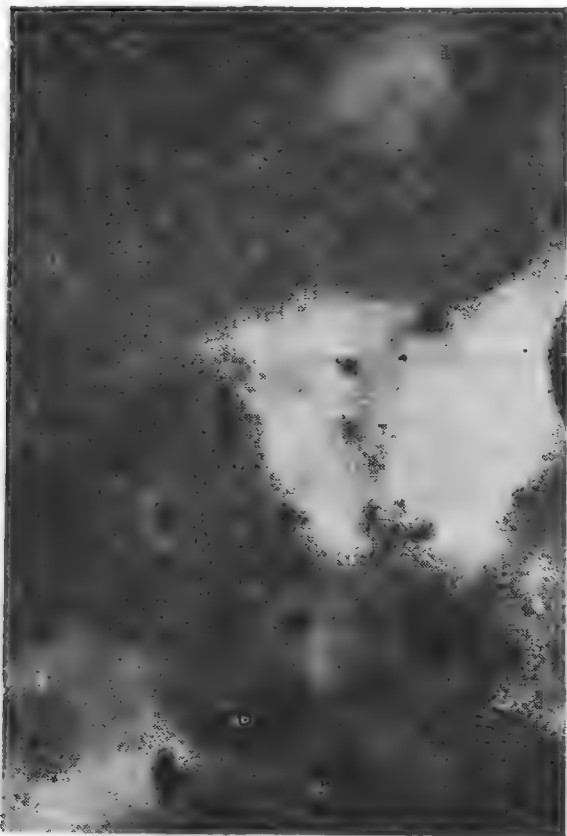


Рис. 3.2. Электронная микрофотография ультратонкого среза набухшей в воде смеси фосфатидов и фосфоинозитидов мозга. Образец фиксирован осмиевой кислотой и на микрофотографии показано сечение вдоль одной из осей образовавшейся структуры. Толщина отдельного липидного слоя ~ 40 А. [Derrachlan D. G., Prog. Biophys. Mol. Biol., 14, 280 (1964).]

тоилфосфатидилхолина составляет $\sim 5 \cdot 10^{-10}$ моль/л, а концентрации мономеров, молекул в монослое и мицелл, подобных изображенным на рис. 3.1, чрезвычайно низки. В то же время образующиеся мицеллы имеют, по-видимому, большие молекулярные массы ($\sim 2 \cdot 10^6$). Если сухой фосфоглицерид поместить в воду и дать ему набухнуть, то будут образовываться главным образом не мицеллярные, а мультислойные структуры, которые при исследовании с помощью электронного микроскопа выглядят как вытянутые многослойные пластины или заключенные друг в друга везикулы (рис. 3.2). Подобные многослойные образования трудно раз-

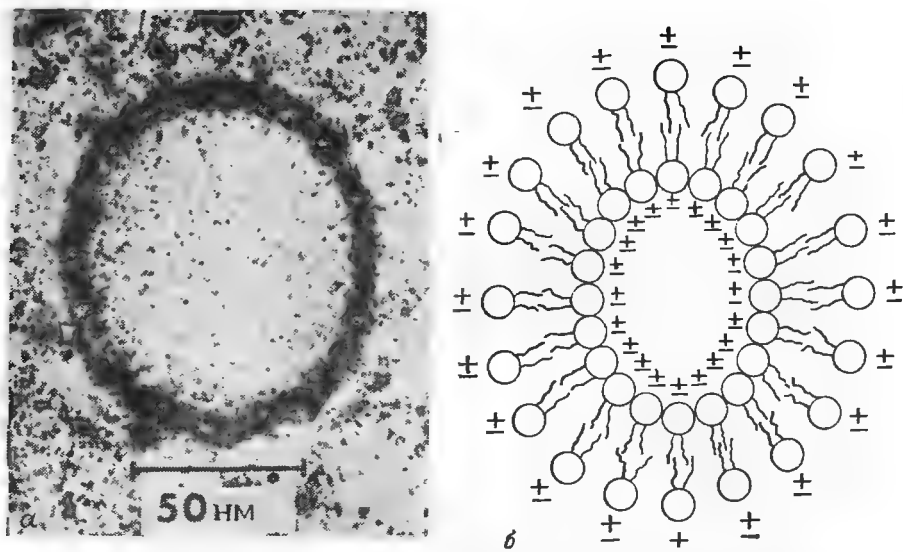


Рис. 3.3. *а* — электронная микрофотография ультратонкого среза везикулы, полученной ультразвуковой обработкой смеси фосфолипидов соевых бобов. После фиксации тетраоксидом осмия образец негативно окрашен. Толщина липидного слоя 45 ± 5 А [Miyamoto V. K., Stoeckenius W., J. Mem. Biol., 4, 257 (1971).] *б* — схематическое изображение бислоя, образующего везикулу типа представленного на рис. *а*. Полярные группы показаны кружочками, а жирные хвосты — волнистыми линиями. Следует подчеркнуть, что везикулы этого типа имеют сферическую или эллипсоидную форму и внутри содержат растворитель. (Масштабы рисунков *а* и *б* не совпадают.)

делить без разрыва индивидуальных слоев. Обработка ультразвуком является одним из основных способов фрагментации мультислойных структур и получения везикул различного размера и формы, образованных липидом и имеющих внутреннюю полость, заполненную водой. Поперечное сечение одной из таких везикул приведено на электронной микрофотографии (рис. 3.3, *а*). Структурный анализ везикул показал, что они образованы *липидным бислоем*, полярные группы которого обращены наружу, а между ними имеется двойной углеводородный слой, как это схематически показано на рис. 3.3, *б*. Итак, в отличие от сурфактантов, которые образуют мицеллы, биологические липиды склонны к формированию бислоев, которые подвергаются самосборке с образованием везикул. Толщина бислоя в таких везикулах практически идентична толщине бислоя биологической мембраны (гл. 11). Таким образом, биологические липиды при определенных условиях путем самоорганизации образуют бислоюную матрицу биологических мембран — ультраструктурных образований, ограничивающих все живые клетки и их внутриклеточные органеллы.

Движущими силами образования липидных бислоев, так же как и образования сурфактантами мицелл, являются гидрофобные взаимодействия, рассмотренные выше. Биологические липиды образуют бислои, так как в отличие от сурфактантов их молекулы имеют, как правило, два гидрофобных хвоста. Сурфактанты могут образовывать мицеллы различного размера и формы. Однако максимальный размер глобулярной мицеллы ограничивается структурой самого сурфактанта, а именно: мицелла достигает своего максимального размера, когда на полярную головку молекулы приходится около $60 \text{ \AA}^2$ площади на поверхности мицеллы. Площадь, приходящаяся на одну полярную головку двухцепочечного амфифила в бислое, примерно соответствует площади, приходящейся на одну головку амфифила с одной цепью в глобулярной мицелле. Однако бислойная структура является оптимальной для двухцепочечных амфифилов, поскольку глобулярные мицеллы этих веществ, имеющие такие же размеры, что и мицеллы сурфактантов, приведенных в табл. 3.6, характеризовались бы слишком большой площадью, приходящейся на одну полярную группу.

Детальному рассмотрению свойств биологических мембран посвящена гл. 11. Здесь следует лишь подчеркнуть, что липиды образуют матрицу биологических мембран, а мембранные белки как бы закреплены в ней. Многие мембранные белки практически невозможно перевести в водный раствор без разрушения мембран. С целью солюбилизации мембранных белков широко используются детергенты (сурфактанты), особенно нейтральные, такие, как детергенты ряда тритона-Х. Считается, что детергенты этого типа включаются в состав мембранных бислоев, и после насыщения мембран детергентом образуются смешанные мицеллы, содержащие и детергент, и мембранные липиды, а белки переходят в раствор.

Другой широко применяемый детергент — *дезоксихолат* (соль желчной кислоты). Его действие, как полагают, обусловлено фрагментацией бислоя с образованием мелких дискообразных кусочков, в которых молекулы солей желчной кислоты экранируют от воды обнажившиеся гидрофобные участки.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

- Ansell G. B., Hawthorne J. N., Dawson R. M. C., eds., Form and Function of Phospholipids*, 2d ed., Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, New York and London, 1973.
- Burchfield H. P., Storrs E. E., Biochemical Application of Gas Chromatography*, Academic Press, Inc., New York, 1962.
- Florkin M., Mason H. S., eds., Comparative Biochemistry*, vol. III, pt. A, chaps. 1—5 and 10; vol. IV, pt. B, chap. 14, Academic Press, Inc., New York, 1962.

- Gundstone F. D.*, An Introduction to the Chemistry and Biochemistry of Fatty Acids and Their Glycerides, Chapman & Hall, Ltd., London, 1967.
- Heftmann E.*, Steroid Biochemistry, Academic Press, Inc., New York, 1970.
- Hilditch T. P., Williams P. N.*, The Chemical Constitution of Natural Fats, 4th ed., Chapman & Hall, Ltd., London, 1964.
- Klyne W.*, The Chemistry of the Steroids, corr. 1st. ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1961.
- Schlettler G., ed.*, Lipids and Lipidoses, Springer-Verlag, New York, Inc., New York, 1967.
- Shoppee C. W.*, Chemistry of the Steroids, 2d ed., Academic Press, Inc., New York, 1964.
- Snyder F., ed.*, Ether Lipids: Chemistry and Biology, Academic Press, Inc., New York, 1972.
- Tanford C.*, The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1973.

Обзорные статьи

- Bangham A. D.*, Lipid Bilayers and Biomembranes, Annu. Rev. Biochem., **41**, 753—776, 1972.
- Carter H. E., Johnson P., Weber E. J.*, Glycolipids, Annu. Rev. Biochem., **34**, 109—142, 1965.
- Hanahan D. J., Thompson G. A., Jr.*, Complex Lipids, Annu. Rev. Biochem., **32**, 215—240, 1963.
- Hawthorne J. N.*, The Inositol Phospholipids, J. Lipid Res., **1**, 255—280, 1960.
- Hawthorne J. N., Kemp P.*, The Brain Phosphoinositides, Adv. Lipid Res., **2**, 127—166, 1964.
- Helenius A., Simons K.*, Solubilization of Membranes by Detergents, Biochim. Biophys. Acta, **415**, 29—79, 1975.
- Kates M.*, Bacterial Lipids, Adv. Lipid Res., **2**, 17—90, 1964.
- Kates M., Wassef M. K.*, Lipid Chemistry, Annu. Rev. Biochem., **39**, 323—351, 1970.
- Ledeer R.*, The Chemistry of Gangliosides: A review, J. Am. Oil Chem. Soc., **43**, 57—66, 1966.
- Stoffel W.*, Sphingolipids, Annu. Rev. Biochem., **40**, 57—82, 1971.

Глава 4

БЕЛКИ. I

Основные структурные особенности. Аминокислоты и пептиды

Термин «протенин» [*protos (греч.)* — первый] впервые применен Мульдером в 1838 г. по предложению Берцелиуса. Это наименование было присвоено сложным азотсодержащим органическим веществам, обнаруженным в клетках животных и растений*. Белки занимают центральное место в структуре живой материи и играют первостепенную роль в ее функционировании. Химические и физические процессы, составляющие основу жизнедеятельности клетки, катализируются ферментами, а все ферменты — белки. Некоторые белки служат структурными элементами, являются гормонами или переносчиками кислорода, участвуют в мышечном сокращении, другие связаны с генетическим материалом или вовлечены в иммунную систему организма в качестве антител. Кроме того, в количественном отношении белки представляют собой основную материал тканей животных; они могут составлять до $\frac{3}{4}$ сухой массы клетки.

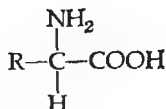
Основная цель химии белка заключается в объяснении физиологической роли белковых веществ на основе изучения их структуры. Этот подход предполагает изучение отдельных частей белковых молекул, выяснение взаимного расположения этих частей в индивидуальных белках, а также исследование химических и физических свойств белков в целом. К настоящему времени выделены сотни различных белков, а у десятков из них детально изучены структуры и функции. Сравнение этих молекул показывает, что в структуре большинства белков имеется много общего. Поэтому, прежде чем приступить к подробному изложению основ химии белка, полезно рассмотреть некоторые основные принципы структурной организации, функционирования и самосборки белков.

* В научной литературе на русском языке чаще используют термин «белок». — *Прим. перев.*

4.1. Основные структурные особенности

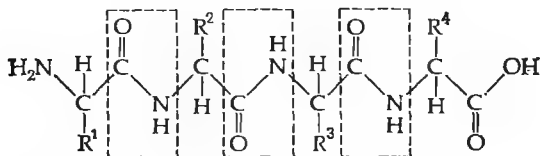
4.1.1. Ковалентная структура

Белки представляют собой макромолекулы с молекулярными массами от ~ 5000 до многих миллионов. В каждой полимерной белковой молекуле в качестве строительных блоков выступают α -аминокислоты. α -Аминокислоты содержат у одного атома углерода (α -углеродного атома) и аминогруппу, и карбоксильную группу:



Обычно в белках встречаются 20 α -аминокислот, различающихся структурой R-группы, которая может быть гидрофильной или гидрофобной, основной, кислой или нейтральной.

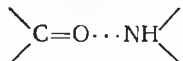
В белках аминокислоты связаны *пептидными связями*, которые представляют собой амидные связи, образованные α -карбоксильными и α -аминогруппами соседних аминокислотных остатков, как показано ниже (в рамки заключены пептидные связи):



Построенные таким образом полимеры называют *пептидами*, а приставки *ди-*, *три-*, *тетра-* и т. д. соответствуют числу остатков в их молекулах (дипептид содержит два остатка, трипептид — три остатка и т. д.). В отличие от небольших *олигопептидов* *полипептидами* обычно называются вещества, содержащие 20 или более аминокислотных остатков. Полипептидные цепи белков включают еще большее число остатков (примерно от 50 до 2500, в зависимости от природы белка). Возможно множество вариантов последовательностей аминокислот в полипептидной цепи. Так, для 20-членного пептида, состоящего из различных аминокислот, существует 20! (т. е. $\sim 2 \cdot 10^{18}$) возможностей их взаимного расположения. Очевидно, что в живой природе реализуется только незначительная доля возможных изомеров белков.

4.1.2. Трехмерная структура

Если бы пептидные связи были единственным фактором, определяющим структуру белков, то пространственная организация любого из них носила бы случайный характер. Понятно, что это не так; полипептидные цепи белков обладают специфической трехмерной структурой, которую называют *конформацией* белка. Точная конформация белка определяется его аминокислотной последовательностью и стабилизируется нековалентными взаимодействиями между группами пептидных связей, а также между R-группами некоторых остатков в полипептидной цепи. К таким нековалентным взаимодействиям относятся в первую очередь водородные связи, а также гидрофобные взаимодействия между неполярными алифатическими и ароматическими R-группами. Типично образование водородных связей между кислородом карбонильной группы и амидной группой пептидных связей:



Многие другие типы водородных связей образуются между этими же атомами и некоторыми полярными R-группами.

Гидрофобные взаимодействия возникают вследствие стремления неполярных боковых цепей избежать соприкосновения с водой подобно тому, как это имеет место у липидов (гл. 3). Водородные связи так же, как и гидрофобные взаимодействия, сами по себе намного слабее ковалентных, но вследствие реализации большого числа таких связей в молекуле белка имеется достаточно энергии для стабилизации его конформации в условиях клетки.

На рис. 4.1 приведена структура белка *цитохрома с*, принцип построения которого типичен для многих детально изученных белков. Внутри глобулы белка имеется много водородных связей, а также алифатических и ароматических R-групп, между которыми возникают гидрофобные взаимодействия. Внутренние гидрофобные области молекулы обычно не содержат воды. В этих областях очень прочны электростатические взаимодействия, хотя они возникают намного реже, чем водородные связи или гидрофобные взаимодействия. Поверхность молекулы в основном гидрофильна, а многие полярные группы, включая положительно и отрицательно заряженные R-группы аминокислот, гидратированы и находятся в контакте с молекулами воды, окружающими белок. Таким образом, поверхность глобулы белка может быть нейтральной или обладать суммарным положительным или отрицательным зарядом в зависимости от рН растворителя, а также количества и природы ионизированных групп в белке. В настоящее время невозможно предсказать конформацию белка, исходя только из знания его аминокислотной последовательности. Однако следует отметить, что кон-

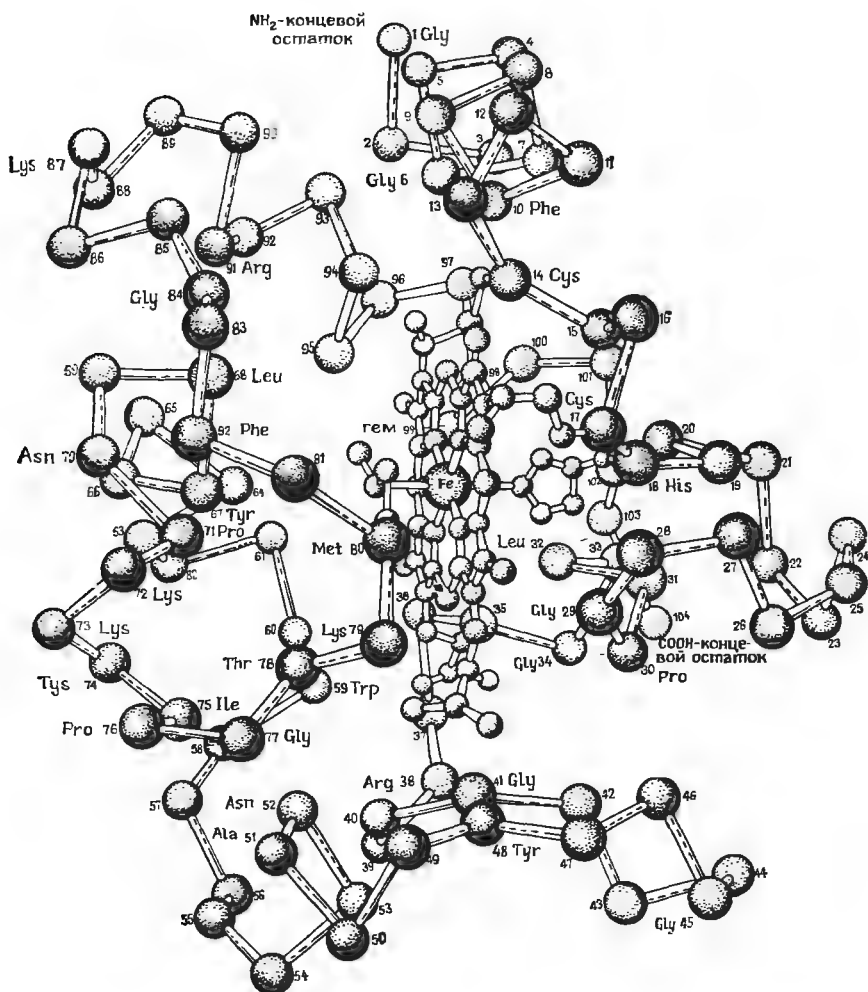


Рис. 4.1. Структурная модель белка цитохрома с. В аминокислотах отмечены только положения α -углеродных атомов; R-группы аминокислот не показаны, за исключением двух остатков цистеина, а также остатков метионина и гистидина, которые связаны с протестической группой — гемом (гл. 31). Стержнями изображены расстояния между α -углеродными атомами. Отдельные аминокислотные остатки пронумерованы, начиная с NH_2 -концевого (1, наверху) и заканчивая COOH -концевым (104, справа внизу). Атом железа в молекуле белка расположен в протестической группе (геме), которая связана ковалентно с полипептидной цепью посредством R-группы цистеина. Лиганды атома железа в геме — сера остатка Met-80 и азот имидазольного кольца остатка His-18. [Dickerson R. E., Timkovich R., in: The Enzymes, Bayer P. D. ed., vol. XI, p. 407, Academic Press, Inc., New York, 1975.]



Рис. 4.2. Схематическое изображение структуры гемоглобина, показывающее конформацию двух α - и двух β -цепей, а также их пространственное взаиморасположение. Латинскими буквами обозначены участки полипептидных цепей, имеющие конформационное сходство. Обе α -цепи (как и обе β -цепи) идентичны, и индексы 1 и 2 используются только для удобства. Диаметр молекулы составляет $\sim 6,4$ нм. Затемненные прямоугольники — гемы каждой из цепей (гл. 31.). [Dickerson R. E., Geis J., The Structure and Action of Proteins, p. 56, Harper & Row, Publishers, Incorporated, New York, 1969.]

формации, обнаруженные в белках с различными аминокислотными последовательностями, представляют собой наиболее энергетически выгодные и стабильные пространственные структуры для любого данного белка с его уникальной последовательностью. Белки являются не статическими, а динамическими структурами, которые могут претерпевать некоторые конформационные изменения в процессе биологического функционирования. Кроме того, R-группы аминокислотных остатков, расположенных на поверхности белковой глобулы, могут обладать значительной свободой движения в растворителе, окружающем молекулу. Некоторые белки состоят только из одной полипептидной цепи, тогда как другие содержат две или более такие цепи, соединенные ковалентными или нековалентными связями. Примером может служить гемоглобин человека, содержащий четыре цепи, различающиеся по аминокислотной последовательности, в том числе две α -цепи (141 аминокислотный остаток) и две β -цепи (146 остатков). Структура этого белка схематически изображена на рис. 4.2. Цепи удерживаются вместе с помощью таких же нековалентных взаимодействий, которые поддерживают конформацию одной полипептидной цепи

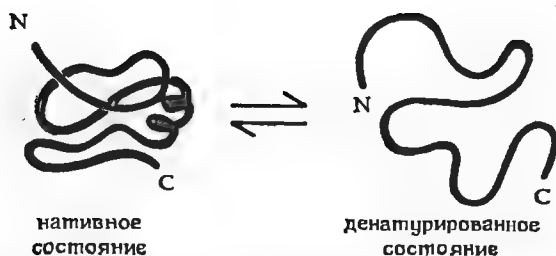


Рис. 4.3. Схематическое изображение конформации нативного белка и процесса его денатурации. В соответствующих условиях денатурация обратима. Буквы N и C относятся соответственно к NH_2 - и COOH -концевым остаткам.

(главным образом водородные связи и гидрофобные взаимодействия). О белках, содержащих более одной полипептидной цепи, говорят, что они состоят из *субъединиц*. Субъединичная структура белка определяется числом и типом полипептидных цепей в молекуле. Таким образом, субъединичная структура гемоглобина обозначается $\alpha_2\beta_2$. Некоторые белки содержат полипептидные цепи, связанные ковалентно дисульфидной связью ($-\text{S}-\text{S}-$), образованной R-группами цистина (разд. 4.2.1). Субъединичная структура фибриногена, белка плазмы крови, превращающегося в фибрин в процессе коагуляции крови (гл. 29), обозначается $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, так как он содержит по две субъединицы трех типов, различающихся аминокислотной последовательностью. Греческие буквы α , β , γ и т. д. обычно используются для обозначения цепей данного белка, т. е. α -цепь гемоглобина не имеет ничего общего с α -цепью фибриногена.

4.1.3. Биологическая активность и структура белка

Специфические биологические функции белков, например ферментов или гормонов, зависят от их конформации, нарушения которой могут вести к потере биологической активности. Поэтому о белке, обладающем нормальной конформацией, говорят, что он находится в *нативном* (естественном) состоянии, а *нативный белок* — это белок, который обладает конформацией, обуславливающей специфическую биологическую функцию молекулы. Довольно мягкие изменения физических условий, в том числе изменение pH, температуры или обработка водными растворами некоторых органических веществ (детергентов, этанола, мочевины или гуанидин-гидрохлорида), могут нарушить эту конформацию. В белках, подвергнутых таким воздействиям, происходит *денатурация*. *Денатурированный белок* существенным образом отличается по своей конформации от нативного белка и лишен биологической активности. Процесс денатурации схематически показан на рис. 4.3.

4.1.4. Классификация белков

Вследствие разнообразия структур и функций белков невозможно провести их удовлетворительную классификацию. Обычно все белки подразделяются на два больших класса: *глобулярные* и *фибриллярные*. Молекулы глобулярных белков имеют сферическую или эллипсоидную форму, а основные особенности их структуры подобны описанным для цитохрома *c* (рис. 4.1) и гемоглобина (рис. 4.2). Такая форма молекул, по-видимому, определяется конформацией отдельных полипептидных цепей (как в моно-, так и в полисубъединичных белках). Глобулярный белок может содержать неаминокислотный компонент — *простетическую группу* (так называемый конъюгированный белок). Пример конъюгированного белка — гемоглобин, каждая полипептидная цепь белковой части которого (глобина) связана с гемом (гл. 31), образуя биологически активную молекулу.

Белки часто классифицируют в соответствии с их простетическими группами. Так, гемоглобин является *гемопротееидом*, а белки, содержащие липиды, углеводы или металлы, называют соответственно *липопротеидами*, *гликопротеидами* и *металлопротеидами*.

Большинство известных белков относится к глобулярным белкам. Первоначально, когда лишь немногие белки были выделены в чистом виде, была предпринята попытка классифицировать глобулярные белки на основе их растворимости в водных средах. В настоящее время эта номенклатура представляет в основном исторический интерес. При такой классификации термин *альбумин* использовался для описания белков, хорошо растворимых в воде и коагулирующих при нагревании; *глобулинами* назывались белки, слабо растворимые в воде, но растворимые в разбавленных растворах солей (например, NaCl). Эти названия продолжают использоваться в литературе (например, сывороточный альбумин и γ -глобулин), но только для некоторых конкретных белков.

Фибриллярные белки — это разнородная группа белковых веществ, содержащих одну или более полипептидных цепей. Молекулы этих белков вытянуты и высокоасимметричны, длина их может во много раз превышать диаметр. Фибриллярными белками являются в первую очередь структурные белки соединительных, эластичных и сократительных тканей, а также нерастворимые белки волос и кожи. Белки этого типа рассмотрены детально в части четвертой.

В растительном и животном мире часто встречаются родственные белки, выполняющие одинаковые функции. Например, фермент лактатдегидрогеназа обнаружен у большинства прокариотических и эукариотических организмов; однако в каждом случае он специфичен для данного вида организмов и несколько отличается

у разных видов по аминокислотной последовательности. Аналогично последовательность α -цепи гемоглобина человека отличается 1, 18 и 50-м остатками от α -цепей гемоглобина гориллы, кролика и карпа соответственно. Тем не менее все эти гемоглобины позвоночных представляют собой переносчики кислорода с субъединичной структурой $\alpha_2\beta_2$ и имеют сходную конформацию и одинаковую биологическую функцию.

4.1.5. Некоторые основные принципы химии белка

Структурную организацию белков, механизм их самосборки и функционирования принято рассматривать в свете трех основных принципов. Во-первых, позднее будет показано (гл. 6), что последовательность аминокислот в полипептидной цепи определяется ДНК-матрицей, направляющей синтез белка (гл. 26). Во-вторых, принимаемая полипептидной цепью трехмерная конформация полностью определяется специфической аминокислотной последовательностью этой цепи, и изменения в последовательности, происходящие вследствие генетических мутаций, приводят к образованию конформационно измененных и частично менее стабильных, менее активных или неактивных белков. В-третьих, специфическая активность белка как фермента, гормона, переносчика кислорода и т. д. зависит от его конформации. Хотя белки представляют собой динамические структуры, даже ограниченные изменения конформации могут привести к потере биологической активности.

4.2. Аминокислоты

Разнообразие аминокислот в природе не ограничивается только теми из них, которые встречаются в белках. Однако в данной главе рассмотрены только те аминокислоты, которые обычно входят в состав белков.

4.2.1. Основные α -аминокислоты белков

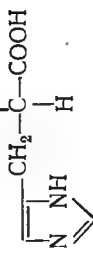
Структуры двадцати α -аминокислот, обычно присутствующих в белках, приведены в табл. 4.1. Удобно разделить все аминокислоты на три группы в зависимости от характера их боковых цепей (R-групп): 1) аминокислоты с ионными боковыми цепями, 2) с полярными неионными боковыми цепями и 3) с неполярными алифатическими или ароматическими боковыми цепями.

Семь аминокислот содержат R-группы, которые могут обладать отрицательным или положительным зарядом. *Аспарагиновая и глутаминовая кислоты* (так называемые кислые аминокислоты)

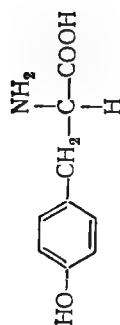
Таблица 4.1

Структура α-аминокислот, часто встречающихся в составе белков

1. Аминокислоты с ионными боковыми цепями

Название и сокращения ^a	Структура	pK ₁ α-COOH	pK ₂	pK _s	pI ^b
Аспарагиновая кислота (Asp, D)	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	1,88	3,65 β-COOH	9,60 α-NH ₃ ⁺	2,77
Глутаминовая кислота (Glu, E)	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	2,19	4,25 γ-COOH	9,67 α-NH ₃ ⁺	3,22
Лизин (Lys, K)	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	2,18	8,95 α-NH ₃ ⁺	10,53 ε-NH ₃ ⁺	9,74
Аргинин (Arg, R)	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$	2,17	9,04 α-NH ₃ ⁺	12,48 гуанидиновая группировка	10,76
Гистидин (His, H)	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array}$ 	1,82	6,00 имидазольное кольцо	9,17 α-NH ₃ ⁺	7,59

Тирозин (Tyr, Y)

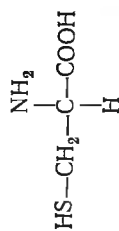


5,66

10,07
фенольный
—OH9,11
 $\alpha\text{-NH}_3^+$

2,20

Цистин (Cys, C)



5,07

10,28
 $\alpha\text{-NH}_3^+$ 8,18
тиольная
группа

1,96

2. Аминокислоты с неионными полярными боковыми цепями

Название и сокращения ^a	Структура	pK_1 $\alpha\text{-COOH}$	pK_2 $\alpha\text{-NH}_3^+$	pI^b
Аспарагин (Asn, N)	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{ }}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\underset{\text{H}}{\overset{\text{NH}_2}{\text{C}}}-\text{COOH}$	2,02	8,80	5,41
Глутамин (Gln, Q)	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{ }}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{H}}{\overset{\text{NH}_2}{\text{C}}}-\text{COOH}$	2,17	9,13	5,65
Серин (Ser, S)	$\text{HO}-\text{CH}_2-\underset{\text{H}}{\overset{\text{NH}_2}{\text{C}}}-\text{COOH}$	2,21	9,15	5,68
Треонин (Thr, T)	$\text{CH}_3-\underset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{CH}}}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{NH}_2}{\text{C}}}-\text{COOH}$	2,09	9,10	5,60

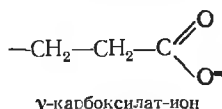
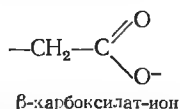
3. Аминокислоты с неполярными алифатическими или ароматическими боковыми

Название и сокращения ^a	Структура	pK ₁	pK ₂	pI ^b
Глицин (Gly, G)	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	2,34	9,60	5,97
Аланин (Ala, A)	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	2,34	9,69	6,00
Валин (Val, V)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\ \diagdown \quad \\ \text{HC}-\text{C}-\text{COOH} \\ / \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{H} \end{array}$	2,32	9,62	5,96
Лейцин (Leu, L)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\ \diagdown \quad \\ \text{HC}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\ / \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{H} \end{array}$	2,36	9,60	5,98
Изолейцин (Ile, I)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2 \quad \text{NH}_2 \\ \diagdown \quad \\ \text{HC}-\text{C}-\text{COOH} \\ / \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{H} \end{array}$	2,36	9,60	6,02

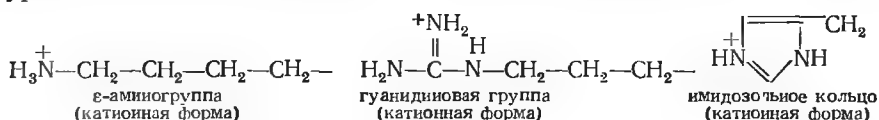
Метионин (Met, M)		2,28	9,21	5,74
Пролин (Pro, P)		1,99	10,60	6,30
Фенилаланин (Phe, F)		1,83	9,13	5,48
Триптофан (Trp, W)		2,83	9,39	5,89

^a Также сокращения используются только при изображении последовательности полипептида или белка.
^b pI=pH в изoeлектрической точке (разд. 4.3.2).

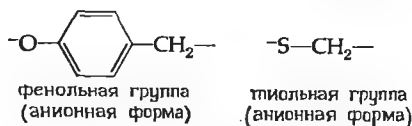
могут нести отрицательный заряд на своих β - и γ -карбоксильных группах соответственно:



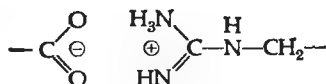
Три аминокислоты, *лизин*, *аргинин* и *гистидин* (так называемые основные аминокислоты), могут нести положительный заряд, поскольку их R-группы способны принимать протон. ϵ -Аминогруппа лизина, гуанидиновая группировка аргинина и имидазольное кольцо гистидина протонируются с образованием следующих структур:



Две другие аминокислоты, *тирозин* и *цистеин*, имеют R-группы, которые также могут нести отрицательный заряд:

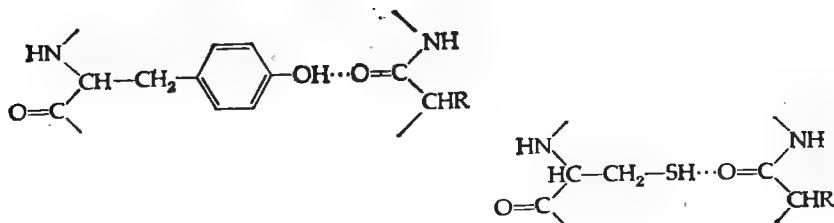


Ионные группы располагаются главным образом на поверхности глобулярных белков и сольватированы посредством водородных связей или ион-дипольных взаимодействий с молекулами воды. Эти группы придают поверхности белка положительные или отрицательные заряды и тем самым обуславливают электростатические свойства белков в растворе. Иногда ионные группы присутствуют в неполярных внутренних областях белковых глобул и между ними возникают электростатические взаимодействия (солевые мостики). Считается, например, что в молекуле дезоксигемоглобина электростатические взаимодействия возникают между остатками аспарагиновой кислоты и аргинина, расположенными в двух различных α -цепях:



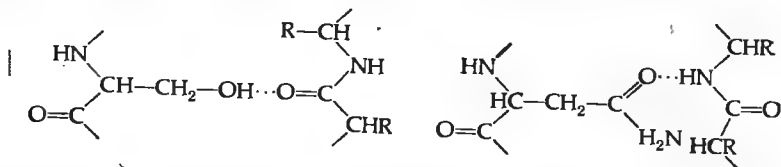
Остатки тирозина и цистеина могут быть погружены в гидрофобные внутренние области белков, поскольку их неионизированные

R-группы могут участвовать в гидрофобных взаимодействиях или в образовании водородных связей, например:



Примером белка, в котором остатки тирозина расположены внутри глобулы, является рибонуклеаза. При денатурации этого белка по мере разворачивания полипептидной цепи упомянутые остатки оказываются на поверхности и теряют протоны. Четыре метиленовых звена лизина и три звена аргинина также могут быть погружены внутрь гидрофобных областей молекулы; однако при этом заряженные ϵ -аминогруппы и гуанидиновая группировка располагаются на поверхности молекулы.

Четыре аминокислоты, встречающиеся в белках, обладают полярными неионными R-группами. Среди них *аспарагин* (β -амид аспарагиновой кислоты), *глутамин* (γ -амид глутаминовой кислоты), *серин* и *треонин* (алифатические аминокислоты, содержащие β -гидроксидную группу). Кислотный и щелочной гидролиз белков приводит к выделению аммиака, образующегося из β - и γ -амидов аспарагиновой и глутаминовой кислот соответственно. Четыре перечисленные аминокислоты достаточно полярны для того, чтобы их R-группы располагались на поверхности белка, сольватированной водой, или, в случае локализации внутри глобулы, образовывали водородные связи с другими полярными группами:



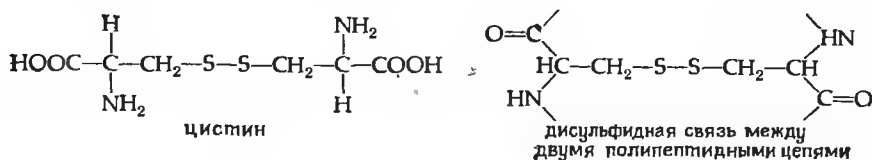
Глицин отличается от других аминокислот отсутствием R-группы. Поэтому остатки глицина могут располагаться как в гидрофобном окружении, так и на поверхности белка. К тому же отсутствие R-группы у остатка глицина делает полипептидную цепь более гибкой, поскольку наличие объемных групп мешает возникновению изгибов и складок. Многие реакционноспособные группы ферментов часто окружены остатками глицина, что облегчает доступ субстратов к поверхности фермента.

Восемь аминокислот обладают неполярными алифатическими или ароматическими боковыми цепями. *Аланин, валин, лейцин, изолейцин и метионин* посредством своих алифатических R-групп участвуют в гидрофобных взаимодействиях с другими R-группами аминокислотных остатков, принадлежащих к этому же классу. *Фенильная* боковая цепь *фенилаланина* и *индольное* кольцо *триптофана* также способны вступать в гидрофобные взаимодействия. Водородный атом азота индольного кольца может участвовать в образовании водородных связей с другими группами, локализованными внутри глобулы белка. К этой группе принадлежит также *пролин* — α -аминокислота, содержащая вторичный амин в пирролидиновом кольце. Наличие в полипептидной цепи остатка пролина позволяет ей изгибаться и складываться «самой на себя».

Хотя неполярные алифатические и ароматические аминокислоты вносят свой вклад в формирование пространственной структуры белков, участвуя главным образом во внутренних гидрофобных взаимодействиях, некоторые R-группы этих остатков располагаются вблизи поверхности глобулы и могут быть обнаружены с помощью специфических реагентов. Например, некоторые остатки тирозина, находящиеся на поверхности белка, нормально взаимодействуют с различными реагентами на фенольную группу, тогда как другие находятся в гидрофобном окружении внутри молекулы и потому неакционноспособны. Вероятность гидратации гидрофобных остатков мала, и потому они могут находиться в поверхностных районах глобулы белка только благодаря стабилизации этих районов сольватированными полярными и ионными группами, расположенными в их непосредственном окружении.

Ароматические аминокислоты ответственны за свойство большинства белков поглощать УФ-излучение (с максимумом между 275 и 285 нм). Из всех ароматических аминокислот наиболее значительным поглощением обладает триптофан (рис. 4.4). Знание молярных коэффициентов поглощения для разных белков оказывается полезным при фотометрическом определении их концентрации в растворе.

Еще одной аминокислотой низкой полярности является *цистин* — дисульфид, образованный двумя остатками цистеина. Благодаря своей структуре цистин может принимать участие в образовании четырех пептидных связей (за счет двух карбоксильных групп и двух аминогрупп):



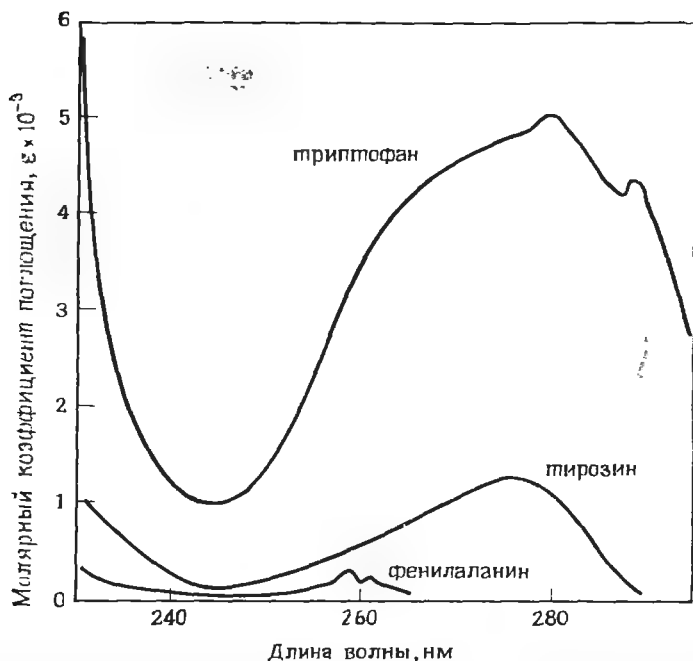


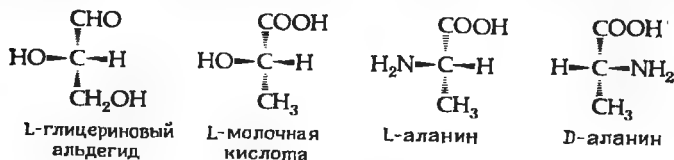
Рис. 4.4. Спектры поглощения триптофана, тирозина и фенилаланина при pH 8. В спектре тирозина при щелочных pH (до pH 12) наблюдается сдвиг полосы поглощения. Вкладом фенилаланина в поглощение белков в области 275—280 нм можно пренебречь. [Fruton J. S., Simmonds S., General Biochemistry, 2d ed., p. 73, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1958.]

Это свойство цистина приводит к возникновению ковалентной дисульфидной связи между двумя удаленными участками полипептидной цепи (внутримолекулярная дисульфидная связь). Дисульфидная связь — также наиболее распространенный тип ковалентной связи между двумя полипептидными цепями (межмолекулярная дисульфидная связь). Дисульфидные связи разрушаются при восстановлении. Поэтому при обработке белков избытком восстановляющего агента (например, меркаптоэтанола или дитиотреитола) при щелочных pH из остатков цистина образуются остатки цистеина.

4.2.2. Стереохимия аминокислот

За исключением глицина, все аминокислоты оптически активны, поскольку их α -углеродный атом является асимметрическим центром. Аминокислоты в белках обладают абсолютной конфигурацией, подобной конфигурации L-аланина, которая, как было

показано, родственна конфигурации L-глицеринового альдегида. С помощью букв **D** и **L**, как и в номенклатуре сахаров (разд. 2.2.1), подчеркивается конфигурационное родство подобных соединений, а не знак оптического вращения. Треонин, цистин и изолейцин имеют по два центра асимметрии. Поэтому каждая из



этих аминокислот, полученная синтетическим путем, представляет собой смесь четырех диастереомеров. Два из них обозначают как **D** и **L**-изомеры соответственно. Две дополнительные диастереомерные формы называются **L-алло**- и **D-алло**-формами; отсюда термины «алло-треонин» и «алло-изолейцин».

4.2.3. Некоторые физико-химические принципы

Прежде чем продолжить обсуждение свойств и поведения аминокислот в растворах, полезно рассмотреть некоторые вопросы теории слабых электролитов.

4.2.3.1. Кислоты и основания

Кислотами называются заряженные или незаряженные соединения, которые при диссоциации в растворах отдают протоны H^+ . Основания принимают эти протоны, получая их из раствора. Согласно такой классификации, аммиак NH_3 , ацетат-ион CH_3COO^- и сульфат-ион SO_4^{2-} — основания, тогда как ион аммония NH_4^+ , уксусная кислота CH_3COOH и бисульфат-ион HSO_4^- — кислоты.

Сильные электролиты, в том числе почти все нейтральные соли (NaCl , Na_2SO_4 , KBr и т. д.), сильные кислоты (HCl , HNO_3 и т. д.) и щелочи (NaOH , KOH и т. д.), в водном растворе ионизованы практически полностью. Слабые электролиты в водном растворе ионизованы лишь частично и образуют смесь недиссоциированных молекул и ионов. Многие кислоты HA — слабые электролиты и диссоциируют частично с образованием протона и аниона, в общем случае — аниона A^- . Из этого следует, что измерение концентрации протонов $[\text{H}^+]$ в растворе слабой кислоты не позволяет определить ее общую концентрацию, поскольку часть молекул находится в недиссоциированной форме HA . Однако в процессе титрования свободных ионов H^+ молекулы HA дополнительно подвергаются диссоциации. В итоге по результатам титрования можно оценить общее количество кислоты, поскольку титруются как свободные ионы H^+ , так и те H^+ , которые образовались из недиссоциированных молекул. Следовательно, для слабых кислот необходимо различать действительную кислотность (концентрация ионов водорода в растворе кислоты) и титруемую кислотность. Для сильных кислот при концентрациях, когда они полностью диссоциированы, титруемая и действительная кислотности совпадают.

Слабая кислота HA обратимо диссоциирует в воде, образуя ионы H^+ и A^- :



Применив закон действующих масс и обозначив концентрации квадратными скобками, получим общее уравнение

$$\frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = K_a \quad (2)$$

где K_a — константа диссоциации кислоты. Уравнение показывает, что K_a характеризует силу кислоты. Чем выше K_a , тем больше ионов водорода выделяется в раствор одним молем кислоты и, следовательно, тем она сильнее. Таким образом, различные кислоты можно сравнивать по их константам диссоциации. Следует иметь в виду, что до сих пор речь шла о концентрациях H^+ , A^- и HA . Более строго, уравнение справедливо если ввести *активности*; концентрации используются здесь только для удобства. В действительности с помощью большинства методов (как электрометрических методов, так и методов, основанных на применении индикаторов) определяется именно активность, а не концентрация протонов.

Уравнения, подобные уравнению (2), точны только в случае использования активностей. Активность связана с концентрацией следующим образом: $a = \gamma c$, где a — активность, c — концентрация, а γ — коэффициент активности, который отражает отклонения от идеального поведения вследствие межмолекулярных взаимодействий. При низких концентрациях, когда такими взаимодействиями можно пренебречь, различия между концентрацией и активностью минимальны.

Обычный растворитель, вода, диссоциирует с образованием водородных и гидроксидных ионов; уравнение диссоциации воды можно записать так:

$$\frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]} = K \quad (3)$$

Поскольку концентрация недиссоциированных молекул воды велика и остается практически постоянной, уравнение (3) обычно упрощается до

$$[H^+][OH^-] = K_w \quad (4)$$

где K_w — ионное произведение воды; при 25 °C $K_w \approx 10^{-14}$.

Для водных растворов уравнение (4) всегда соблюдается. Поэтому изменение $[H^+]$ или $[OH^-]$ должно вызывать немедленное компенсирующее изменение концентрации другого иона. Таким образом, ионное произведение воды имеет фундаментальное значение при рассмотрении поведения кислот и оснований в растворе.

В биологии обычно используют преобразованное уравнение закона действующих масс, применимое в общей форме и для кислот, и для оснований. Уравнение (2) может быть представлено в виде

$$[H^+] = \frac{K_a [HA]}{[A^-]} \quad (5)$$

Прологарифмировав обе части этого уравнения, получим

$$\lg [H^+] = \lg K_a + \lg [HA] - \lg [A^-] \quad (6)$$

Затем умножив на -1 , получим

$$-\lg [H^+] = -\lg K_a - \lg [HA] + \lg [A^-]$$

Выражение $-\lg [H^+]$ было обозначено Сёренсеном как pH, а $-\lg K_a$ — как pK_a . Подстановка этих обозначений в уравнение (7) приводит к важной формуле

$$pH = pK_a + \lg \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (7)$$

Следует отметить, что уравнение (7) применимо к растворам всех слабых кислот и солей слабых кислот

Можно преобразовать уравнение (4) следующим образом:

$$\lg [H^+] + \lg [OH^-] = \lg K_w \quad (8)$$

Умножив на -1 , получим

$$-\lg [H^+] - \lg [OH^-] = -\lg K_w$$

Подставив вместо $-\lg [H^+]$ pH, вместо $-\lg [OH^-]$ pOH и т. д., получим формулу

$$pH + pOH = pK_w \quad (9)$$

С помощью pH можно охарактеризовать как кислотность, так и основность раствора. Поскольку $pK_w = 14$, то можно легко найти pH раствора, зная pOH. На практике параметр pOH используется редко; кислотность и основность всех растворов выражается в шкале pH. Поскольку pH — логарифмическая величина, то с ней следует обращаться так же, как с другими логарифмическими величинами. Для нейтральных растворов pH = 7. Поскольку $pK_w = 14$, то pOH = 7, или $[H^+] = 10^{-7}$ моль/л = $[OH^-]$. Очевидно, что гораздо удобнее использовать логарифмическую шкалу pH, чем обычную экспоненциальную. Это видно из следующего примера: для нейтрального раствора, где pH = 7,0, $[H^+] = 0,000\,000\,1$, или 10^{-7} моль/л, для раствора с pH 6,0 $[H^+] = 0,000\,001$, или 10^{-6} моль/л. Различие между этими двумя значениями лучше воспринимается в логарифмической шкале (pH 7 или 6). Шкала pH разбита на 14 единиц и служит для оценки кислотности растворов, начиная 1,0 н. растворами кислот (pH 0) и заканчивая 1,0 н. растворами щелочей (pH 14). Это особенно удобно для графического изображения изменений $[H^+]$.

Для того, чтобы рассчитать pH раствора с известной концентрацией ионов водорода, нужно найти логарифм $[H^+]$ и изменить его знак на обратный. Например, найдем, чему равен pH раствора, содержащего $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л H^+ :

$$\lg 2 \approx 0,30, \lg 10^{-5} = -5, \text{ тогда } \lg (2 \cdot 10^{-5}) = 0,30 - 5 = -4,70$$

pH данного раствора составляет 4,70. Следует помнить, что изменение pH на единицу эквивалентно десятикратному изменению концентрации ионов водорода, поскольку в основе шкалы pH лежат десятичные логарифмы.

Буферные растворы «стремятся воспрепятствовать» изменению $[H^+]$, которое может быть вызвано добавлением кислот или оснований. Обычно буферное действие оказывают ионы слабых кислот и оснований. Сильные кислоты и основания в воде диссоциированы практически полностью и не содержат резервного количества недиссоциированных молекул. Слабые электролиты, проявляющие буферные свойства, имеют важное практическое значение для живых систем, поскольку большинство клеток может выжить в довольно узкой области pH.

На практике наилучшим буферным действием обладает смесь слабой кислоты HA и ее соли BA. Можно считать, что соль диссоциирует полностью; следовательно, BA существует в растворе в виде B^+ и A^- . Примем, что слабая кислота HA с $pK_a = 5$ дает только 10^{-5} моля H^+ и A^- на каждый моль кислоты, и потому в первом приближении ее можно считать практически недиссоциированной. Вклад кислоты в концентрацию иона A^- ничтожно мал по сравнению с вкладом соли BA, и им можно пренебречь; поэтому $[A^-]$ можно приравнять концентрации соли. Таким образом, уравнение (7) можно записать в следующем виде:

$$pH = pK_a + \lg \frac{[\text{соль}]}{[\text{кислота}]} \quad (10)$$

где $[\text{соль}] = [A^-]$, а $[\text{кислота}] = [HA]$. Уравнение (10) известно под названием уравнения Хендерсона — Хассельбаха. Если слабая кислота HA и ее соль BA

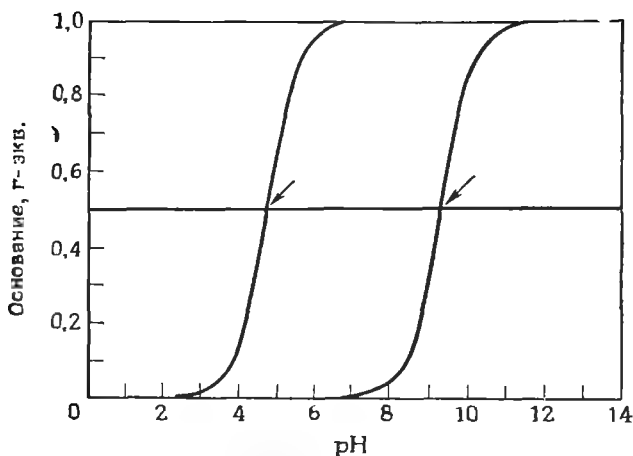


Рис. 4.5. Рассчитанные кривые титрования одного эквивалента уксусной кислоты ($pK_a=4,7$) и иона аммония ($pK_a=9,3$). pH раствора после добавления 0,5 экв. основания равен pK . Форма этой кривой одинакова для всех одноосновных кислот; положение кривой определяется pK титруемого вещества.

присутствуют в растворе в одинаковых концентрациях (по 0,1 моль/л), то

$$pH = 5 + \lg \frac{0,1}{0,1}$$

т. е. pH раствора равен 5. Если добавить в раствор 0,01 моля VOH , то образуются дополнительные 0,01 моля соли VA и 0,01 моля H_2O (последними можно пренебречь, поскольку их вклад в общее количество воды в растворе ничтожно мал). pH полученного раствора можно снова рассчитать с учетом увеличения концентрации соли и уменьшения концентрации кислоты:

$$pH = 5 + \lg \frac{0,11}{0,09}$$

Значение pH увеличилось всего на 0,09 и стало равно 5,09. Аналогично добавление 0,01 моля сильной кислоты уменьшило бы pH на 0,09, а конечное значение pH стало бы равно 4,91.

Сопоставим такое поведение описанного буферного раствора с поведением раствора сильной кислоты, например HCl , при том же значении pH 5. Концентрация HCl при этом pH составляет 0,000 01 моль/л, и добавление 0,01 моль основания изменяет pH раствора почти до 12, т. е. на 7 единиц, что происходит из-за отсутствия «резервных» педиссоциированных молекул кислоты. Даже при pH 2 (0,01 моль/л HCl) добавление 0,01 моля основания повышает pH до нейтрального, т. е. на 5 единиц.

Следует подчеркнуть, что в области pH 2—12, где слабые кислоты и основания проявляют свои буферные свойства, буферная емкость различных систем представляет основу поддержания постоянного pH. В нейтральной области pH, в которой функционирует большинство живых клеток, биологически наиболее важными являются буферные пары угольной и фосфорной кислот.

Уравнения (7) и (10) записаны в такой форме, которая очень удобна для рассмотрения процесса титрования всех слабых электролитов. На рис. 4.5 пока-

зана кривая титрования одноосновной слабой кислоты. pH в средней точке этой кривой, соответствующей 50% необходимой для титрования кислоты (или основания), и есть значение pK , поскольку в этой точке $[сопь]/[кислота]=1$, а $\lg[сопь]/[кислота]=0$. Буферная емкость максимальна при $pH=pK$ и уменьшается в более кислых или более основных растворах. Таким образом, буферная емкость определяется главным образом отношением концентраций соли и кислоты. Когда это отношение равно единице, $pH=pK$ и буферная емкость максимальна. На рисунке это соответствует точке перегиба кривой титрования, а pH в точке перегиба дает pK . Следует подчеркнуть еще раз, что растворы слабой кислоты или соли слабой кислоты по отдельности не проявляют свойств полной буферной системы.

В случае многоосновных кислот каждая группа имеет свое характеристическое значение pK , которое можно определить по уравнению (7). В табл. 4.2

Таблица 4.2

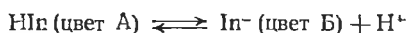
Значения pK_a некоторых полезных и биологически важных соединений

Соединение	pK_a	Соединение	pK_a
Фосфорная кислота (pK_1)	2,0	Лимонная кислота (pK_3)	6,4
Лимонная кислота (pK_1)	3,1	Фосфорная кислота (pK_2)	6,7
Муравьиная кислота	3,8	Имидазол	7,0
Молочная кислота	3,9	Диэтилбарбитуровая кислота	8,0
Бензойная кислота	4,2	Трис(оксиметил)аминометан	8,1
Уксусная кислота	4,7	Борная кислота	9,2
Лимонная кислота (pK_2)	4,7	Ион аммония	9,3
Пиримидиний-нон	5,3	Ион этиламмония	9,8
Какодиловая кислота	6,2	Ион триэтиламмония	10,8
Маленновая кислота	6,2	Угольная кислота (pK_2)	10,4
Угольная кислота (pK_1)	6,3	Фосфорная кислота (pK_3)	12,4

приведены значения pK ряда соединений, которые либо используются для приготовления буферных растворов, либо интересны как компоненты биологически важных буферных систем.

Индикаторы

Многие слабые электролиты в различных областях pH могут быть либо характерно окрашены, либо бесцветны. Эти вещества используются в качестве индикаторов при определении pH растворов. В общем виде можно представить себе, что индикатор — это кислота HI_n , которая может существовать в двух различно окрашенных формах:



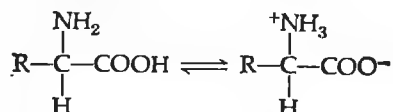
Из уравнения Хендерсона — Хассельбаха следует

$$\text{pH} = \text{pK} + \lg \frac{[\Pi^-]}{[\text{H}\Pi]}$$

При любом pH отношение $[\Pi^-]/[\text{H}\Pi]$ соответствует отношению значений оптической плотности при двух определенных длинах волн (цвет Б/цвет А). Такую смесь окрашенных веществ можно визуальнo сравнивать с цветными стандартами и таким образом проводить быстрое определение pH. Перечень широко применяемых индикаторов и сведения об их свойствах можно найти в химических справочниках.

4.2.4. Аминокислоты как электролиты

α -Аминокислоты существуют в водных растворах преимущественно в виде *биполярных ионов*. Как было установлено для нескольких α -моноаминомонокарбоновых кислот, отношение числа биполярных ионов к числу незаряженных молекул в состоянии равновесия между этими формами



составляет 10^5 — 10^6 . Хотя для удобства α -аминокислоты часто изображают в виде незаряженных молекул, все они существуют в растворах в форме анионов, катионов, электронейтральных биполярных ионов или смеси этих форм, причем доминирование какой-либо из них зависит от pH раствора. Значение pH, при котором биполярный ион не перемещается в электрическом поле, называют *изoeлектрической точкой* (pI); при таком pH число положительных и отрицательных зарядов в белке одинаково. pH раствора чистой аминокислоты в воде называется *изоионной точкой*. Изoeлектрические и изоионные точки аминокислоты в разбавленных растворах приблизительно совпадают.

α -Аминокислоты имеют по крайней мере две (потенциально) кислотные группы: недиссоциированную карбоксильную группу и протонированную аминогруппу. Гидрохлориды аминокислот — сильные электролиты и в воде диссоциируют



образуя катион (справа). Этот катион содержит две слабокислотные группы с характеристическими значениями pK ; для удобства эти значения pK обозначены pK_1 , pK_2 и т. д. (чем меньше номер, тем к более сильной кислотной группе относится константа). Таким образом, константа диссоциации pK_1 упомянутой аминокислоты от-

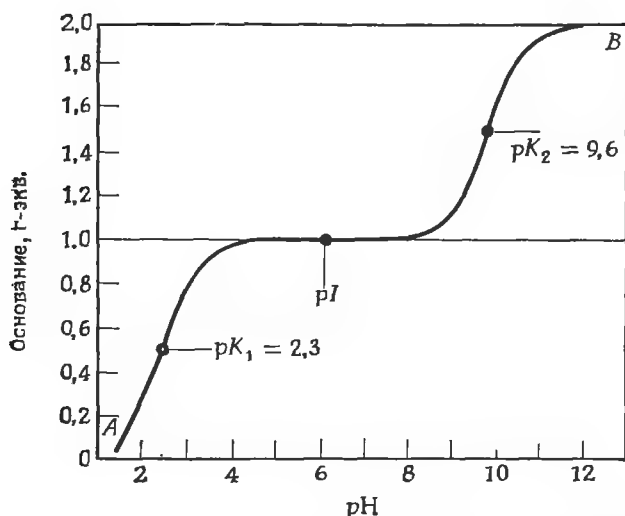
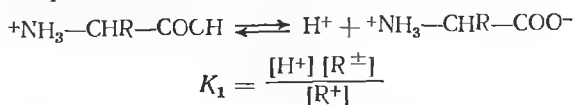
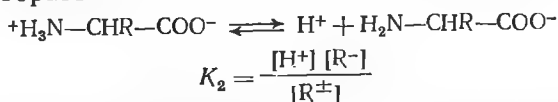


Рис. 4.6. Кривая титрования моноаминомонокарбоновой кислоты, например глицина ($pK_1=2,3$; $pK_2=9,6$). В кислом растворе *A* глицин существует в виде глицин-гидрохлорида; в растворе *B* — в виде глицината натрия. Изoeлектрическая точка $pI=6$ (разд. 4.2.4).

носится к ее карбоксильной группе:



где R^+ — катион (слева), а $\text{R}^\pm$ — биполярный ион (справа). Если раствор гидрохлорида аминокислоты титровать, добавляя 2 экв. NaOH , то зависимость изменения pH от количества добавленных эквивалентов OH^- будет иметь вид, представленный на рис. 4.6. После добавления 0,5 экв. основания pH раствора становится равным pK_1 (pK карбоксильной группы); при этом в растворе присутствуют равные количества R^+ и $\text{R}^\pm$. После добавления 1 экв. основания доминирующей формой становится $\text{R}^\pm$ (биполярный ион), а pH раствора — равным pI . Биполярный ион — также слабая кислота благодаря наличию аммонийной группы, диссоциирующей следующим образом:

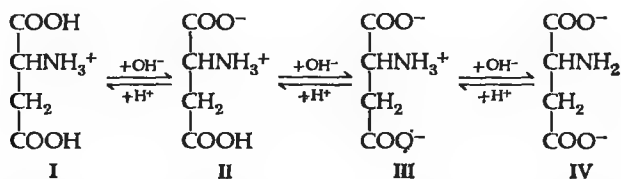


где $\text{R}^\pm$ — биполярный ион (слева), а R^- — анион (справа). Добавление 1,5 экв. основания к раствору аминокислоты приводит к титрованию аммонийной группы, в результате чего pH достигает pK_2

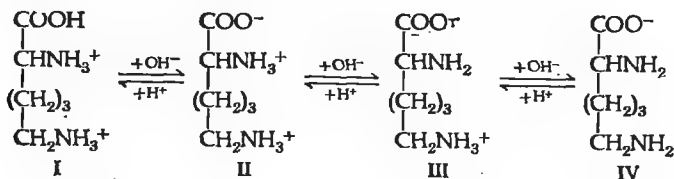
(pK аммонийной группы). 2 экв. щелочи полностью оттитровывают аминокислоту. Полученный раствор содержит только анионы (R^-).

Рассмотрение хода титрования моноаминомонокарбоновой кислоты (рис. 4.6) позволяет сделать три важных вывода. Во-первых, все α -аминокислоты при любых pH ведут себя как сильные электролиты. Различные формы аминокислот (катионы, биполярные ионы, анионы или комбинации этих форм) существуют в растворе в виде ионных солей. Многие свойства аминокислот более характерны для солей, чем для неионных органических соединений; к таким свойствам аминокислот относятся высокие температуры плавления, хорошая растворимость в воде и низкая растворимость в неполярных растворителях, подобных эфиру и хлороформу. Во-вторых, изоэлектрическая точка аминокислоты определяется значениями двух констант диссоциации. При рассмотрении кривой титрования (рис. 4.6) видно, что для моноаминомонокарбоновой кислоты изоэлектрическая точка равна среднему арифметическому pK_1 и pK_2 . В-третьих, растворы всех аминокислот обладают буферными свойствами, причем их буферная емкость максимальна при pH , равных значениям pK кислотных групп. Например, раствор аминокислоты, кривая титрования которой показана на рис. 4.6, обладает высокой буферной емкостью при pH 2,3 (pK_1) и pH 9,6 (pK_2). Аминокислоты не проявляют буферных свойств в изоэлектрической точке.

Кривые титрования аминокислот, содержащих три кислотные группы, имеют три точки перегиба, соответствующие pK каждой из этих групп. Титрование полностью протонированных форм таких аминокислот требует 3 экв. основания, как, например, в случае аспарагиновой кислоты:



Изоэлектрическая форма аспарагиновой кислоты соответствует структуре II, поскольку только она электронейтральна. Аналогично ионными формами лизина являются следующие:



Изоэлектрической форме лизина соответствует структура III. Для расчета pI аминокислот полезно уравнение

$$pI = \frac{pK_n + pK_{n+1}}{2}$$

где n — максимальное число положительных зарядов в полностью протонированной аминокислоте. Для аспарагиновой кислоты $n=1$, а для лизина $n=2$; для моноаминомонокарбоновой α -аминокислоты также $n=1$. Используя значения pK кислотных групп аминокислот, приведенные в табл. 4.1, можно легко вычислить pI любой аминокислоты.

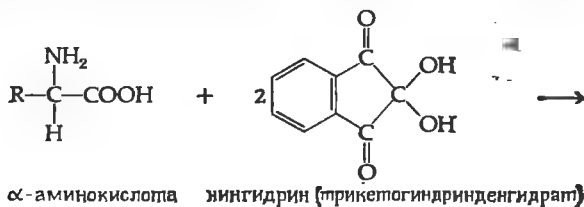
4.2.5. Химические свойства аминокислот

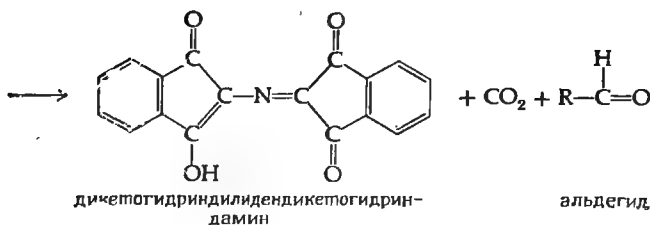
Аминокислоты вступают во многие химические реакции благодаря наличию в их молекулах нескольких реакционноспособных групп. Алифатические моноаминомонокарбоновые кислоты проявляют химические свойства, типичные для карбоксильной группы и аминогруппы. Другие аминокислоты, кроме того, вступают в реакции, в которых принимают участие функциональные группы их боковых цепей. Например, цистеин вступает в реакции, характерные для сульфгидрильной группы ($-\text{SH}$), тирозин — в реакции фенольной группы и т. д. Такие же реакции характерны для белков, содержащих соответствующие R-группы.

4.2.5.1. Реакция с нингидрином

Аминокислоты взаимодействуют с нингидрином (гидратом трикетогидриндена) с образованием CO_2 , аммиака и альдегида, содержащего на один атом углерода меньше, чем соответствующая аминокислота. В результате реакции возникает голубое или фиолетовое окрашивание, что позволяет осуществить колориметрическое количественное определение аминокислот. Однако эта цветная реакция не является специфической для аминокислот, поскольку окрашенный продукт с нингидрином дает и NH_3 , и многие другие соединения, содержащие аминогруппу (в том числе пептиды и белки), с тем лишь отличием, что при этом не выделяется CO_2 . Поэтому образование CO_2 при реакции с нингидрином — характерный признак присутствия свободной карбоксильной группы, расположенной рядом с аминогруппой, т. е. специфично для α -аминокарбоновых кислот. Пролин и оксипролин при реакции с нингидрином образуют производное, окрашенное в желтый цвет.

Реакция нингидрина с α -аминокислотой протекает следующим образом:





4.2.5.2. Специфические реакции аминокислот

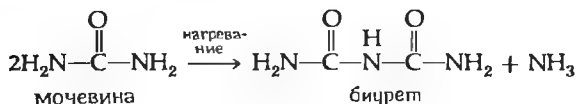
Цветные реакции отдельных аминокислот широко используются для аналитических целей. В такие реакции вступает также большинство белков, что помогает при их количественном определении или идентификации. Некоторые из перечисленных ниже реагентов используются для опрыскивания бумажных хроматограмм с целью обнаружения отдельных аминокислот или пептидов, содержащих эти аминокислоты (разд. 5.6.3.2).

Реакция Сакагучи. Гуанидины при взаимодействии с α -нафтолом и гипохлоридом натрия в щелочной среде дают красное окрашивание; эта реакция применяется для обнаружения аргинина.

Реакция с альдегидами. Производные индола при взаимодействии со многими ароматическими альдегидами образуют интенсивно окрашенные продукты. *n*-Диметиламинобензальдегид в H_2SO_4 при реакции с триптофаном дает красно-фиолетовое окрашивание (*реакция Эрлиха*). Эта реакция может быть использована для количественного определения триптофана в белках.

Реакция Паули на гистидин и тирозин. Гистидин и тирозин в щелочных растворах реагируют с диазотированной сульфаниловой кислотой, образуя производные, окрашенные в красный цвет.

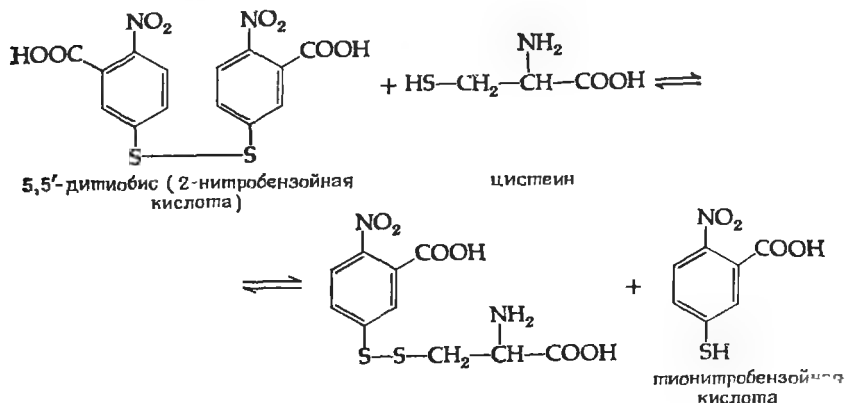
Биуретовая реакция. α -Аминокислоты в пептидах дают биуретовую реакцию, которая используется для качественного и количественного определения белка в растворе с помощью спектрофотометрических методов. Биурет образуется при нагревании мочевины до $\sim 180^\circ\text{C}$.



В присутствии сильной щелочи биурет дает с раствором CuSO_4 фиолетовое окрашивание. В биуретовую реакцию вступают пептиды, содержащие по крайней мере две пептидные связи, т. е. трипептиды и т. д. Дипептиды и аминокислоты (кроме гистидина, серина и треонина) не вступают в эту реакцию.

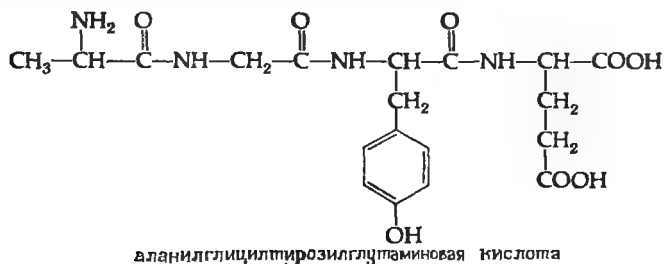
Реагент Элмана. Существует много методов обнаружения тиоловых групп цистеина в пептидах и белках. Один из них — реакция с 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислотой), в результате которой происходит образование тионитробензойной кислоты, обладающей в слабощелочной среде (рН 8) сильным погло-

щением при 412 нм. Поэтому количество образующегося в результате реакции продукта может быть определено спектрофотометрически.



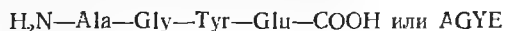
4.2.6. Номенклатура

Согласно номенклатуре пептидов, аминокислотные остатки перечисляются в порядке их расположения в цепи, начиная со свободной α -аминогруппы, которую при изображении структуры пептида обычно располагают слева. Название каждого остатка получает окончание -ил, за исключением концевой остатка, несущего незамещенную карбоксильную группу. Тетрапептид аланилглицилтирозилглутаминовая кислота имеет следующую структуру:



Названия аминокислотных остатков образуются, как уже было упомянуто, путем добавления окончания -ил. Таким образом, названия глицил, аланил, серил и т. д. используются соответственно для остатков глицина, аланина, серина. Не следует путать глутамил и глутаминил, а также аспартил и аспарагинил. При написании последовательностей длинных пептидов вместо полного названия удобно использовать трех- или однобуквенные обозначения. В табл. 4.1

приведены общепринятые обозначения, используя которые вышеупомянутый тетрапептид можно записать следующим образом:



Такие сокращения применяются только для обозначения остатков в последовательности, но не для свободных аминокислот.

4.2.7. Синтез пептидов

Органический синтез сложных пептидов сопряжен с определенными методическими трудностями. Прежде всего для того, чтобы соединить аминокислоты специфической пептидной связью, следует «защитить» те их амино- и карбоксильные группы, которые не должны участвовать в ее образовании, и таким образом снизить их реакционную способность. Кроме того, нужно блокировать все реакционноспособные боковые цепи аминокислот или проводить реакцию с образованием связи между аминокислотами таким способом, при котором эти группы не затрагиваются. Некоторые из защитных групп, используемых в пептидном синтезе, приведены в табл. 4.3. Далее конденсация должна проводиться таким образом, чтобы не происходило рацемизации или химического изменения боковых цепей. Большинство реакций образования пептидной связи включают активацию α -карбоксильных групп, обычно путем получения определенных типов смешанных ангидридов кислот или реакционноспособных сложных эфиров;

Таблица 4.3

Некоторые защитные группы, используемые в пептидном синтезе

Защитная группа	Блокируемая группа	Метод удаления защитной группы
Карбобензоксигруппа (Cbz)	Аминогруппа	H_2 /палладиевая чернь; HBr в уксусной кислоте
Трифенилметильная (три-тильная)	»	H_2/Pd
<i>трет</i> -Бутоксикарбонильная	»	Трифторуксусная кислота
Фталильная	»	Гидразин
Трифторацетильная	»	Слабая щелочь
Бензильная	Сульфгидрильная	Металлический натрий в жидком аммиаке
<i>n</i> -Толуолсульфонильная (тозилъная)	Аминогруппа	То же
Этокс- или метоксифирная	Карбоксильная	Слабая щелочь
Бензоксифирная	»	Слабая щелочь; H_2/Pd
<i>трет</i> -Бутоксифирная	»	Трифторуксусная кислота; HBr в уксусной кислоте
Ацетильная	Гидроксидная	Слабая щелочь

Таблица 4.4

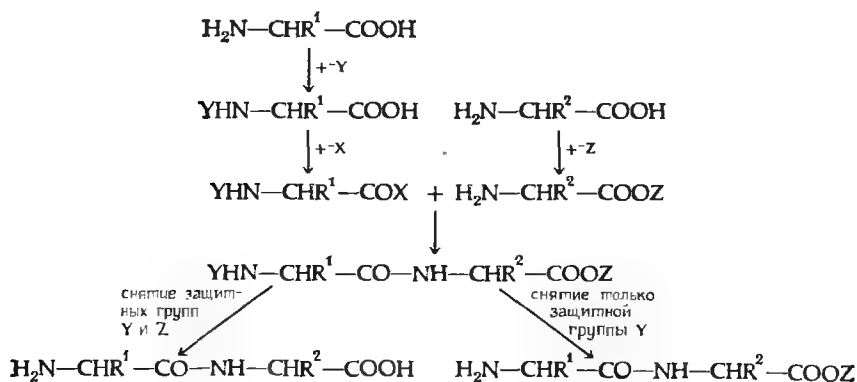
Некоторые конденсирующие реагенты, применяемые в пептидном синтезе

Конденсирующий реагент	Структура	Смешанный ангидрид
Дициклогексилкарбодиимид (ДЦКД)		
Изобутилхлорформат	$\text{C}_4\text{H}_9\text{—O—C(=O)—Cl}$	$\text{R—C(=O)—O—C(=O)—O—C}_4\text{H}_9$
N,N'-Карбонилдиимидазол		
<i>n</i> -Нитрофениловый эфир ^a		$\text{R—C(=O)—O—C}_6\text{H}_4\text{—NO}_2$

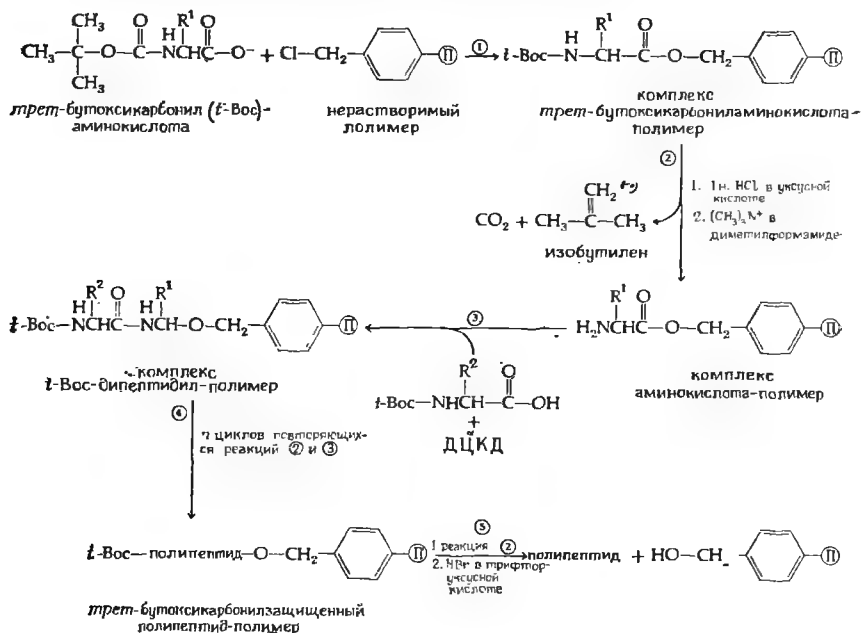
^a Получают при взаимодействии аминокислоты и *p*-нитрофенола в присутствии ДЦКД.

некоторые из них приведены в табл. 4.4. И наконец, защитные группы должны удаляться количественно в мягких условиях, в которых не происходит перегруппировок, рацемизации или разрывов образованных пептидных связей.

Если группы, блокирующие NH_2 - и —COOH , обозначить соответственно Y и Z, а соединение, образующее смешанный ангидрид, — X, то синтез дипептида можно представить в виде следующей серии реакций:



аминокислоты выход на каждой стадии приближается к 100%. Для многократного автоматического повторения всего процесса были сконструированы специальные приборы. В твердофазном синтезе часто используются *трет*-бутоксикарбонильные производные аминокислот в сочетании с применением на стадии образования пептидной связи дициклогексилкарбодимида (ДЦКД). Этот процесс может быть проиллюстрирован приведенным ниже циклом реакций с целью синтеза гипотетического полипептида. COOH -Концевую γ -защищенную аминокислоту с боковой R^1 -группой по реакции 1 присоединяют к нерастворимому полимеру П. При этом образуется комплекс аминокислота — полимер. После удаления защитных групп (реакция 2) по реакции 3 присоединяется следующая аминокислота с образованием блокированного дипептида. Повторяя реакции 2 и 3, получают полипептид желаемой длины и последовательности, который может быть отделен от нерастворимого полимера по реакции 5.



С помощью существующих методов пептидного синтеза были получены многие природные полипептиды, некоторые белковые гормоны, в том числе инсулин (гл. 46), гастрин (гл. 34) и паратгормон (гл. 43), а также фермент рибонуклеаза. Таким образом, с помощью пептидного синтеза была доказана правильность структур, установленных с помощью методов деградации. Пептидный синтез используют также для получения аналогов природных соединений с целью исследования роли каждой боковой цепи или остатка в проявлении биологической активности, а также для получения соединений с наиболее подходящими для терапевтических целей свойствами.

См. литературу к гл. 6.

Глава 5

БЕЛКИ. II

Определение молекулярной массы.

Форма белковых молекул. Амфотерные свойства.

*Растворимость. Методы выделения
биологических макромолекул*

5.1. Определение молекулярной массы

Молекулярные массы некоторых типичных белков, приведенные в табл. 5.1, указывают на большое разнообразие их размеров. Для детального изучения взаимосвязи структуры и функции любого белка необходимо знание его молекулярной массы. В следующих

Таблица 5.1

Молекулярные массы и изоэлектрические точки некоторых белков

Белок	Молекулярная масса	pI ^a
Цитохром с	13 000	10,6
Рибонуклеаза	14 000	7,8
Миоглобин лошади	17 000	7,0
Гормон роста человека (соматотропин)	21 500	6,9
Карбоксипептидаза	34 000	6,0
Пепсин	35 500	<1,0
Яичный альбумин	40 000	4,6
Гемоглобин лошади	65 000	6,9
Сывороточный альбумин	66 500	4,8
Сывороточный γ-глобулин	160 000	6,4—7,2
Каталаза	250 000	5,6
Фибриноген	330 000	5,5
Уреаза	480 000	5,1
Тиреоглобулин	660 000	4,6
Гемоцианин осьминога	2 800 000	

^a pH в изоэлектрической точке (см. разд. 5.3).

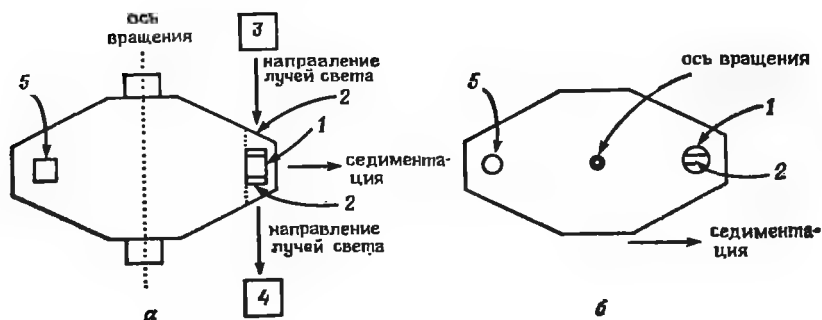


Рис. 5.1. Схема устройства ротора ультрацентрифуги. а — вид сбоку; б — вид сверху. 1 — ячейка; 2 — кварцевое стекло; 3 — источник света; 4 — оптическая анализирующая система; 5 — противовес.

разделах описываются некоторые методы определения молекулярных масс белков, причем особое внимание обращается на ряд наиболее важных свойств белковых молекул в растворе.

5.1.1. Метод измерения скорости седиментации

Скорость осаждения частицы в центрифужной пробирке под действием центробежной силы зависит, во-первых, от величины этой силы, во-вторых, от размера, формы и плотности частицы и, в-третьих, от плотности и вязкости растворителя. Центробежные силы, достигаемые в настоящее время, позволяют производить разделение только относительно крупных молекул. Современные центрифуги, основанные на использовании высокоскоростных электрических двигателей, способны развивать скорость до 75 000 об/мин, и получаемая при этом центробежная сила в 400 000 раз превосходит силу земного притяжения. Вращение роторов в таких центрифугах происходит в вакууме для того, чтобы свести к минимуму сопротивление воздуха и уменьшить нагревание при трении.

Для понимания поведения белков в центробежном поле полезно рассмотреть устройство ротора ультрацентрифуги (рис. 5.1), а также обсудить изменение концентрации белка в ячейке ультрацентрифуги в процессе седиментации (рис. 5.2). В результате постепенного изменения концентрации белка через некоторое время образуется четкая граница между растворителем и раствором белка. Измерение положения этой границы в зависимости от времени позволяет определить константу седиментации, являющуюся функцией молекулярной массы. За скоростью седиментации можно следить с помощью нескольких методов. Один из них заключается в следующем: через кювету пропускают ультрафиолетовый свет (230—290 нм) и регистрируют его поглощение (величина которого про-

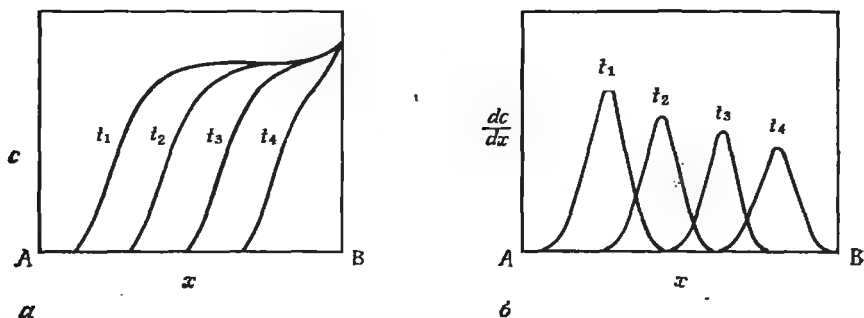


Рис. 5.2. Изменение концентрации c белка (а) и градиента концентрации dc/dx (б) в ячейке ультрацентрифуги на различных стадиях центрифугирования. Направление седиментации — слева направо. А — верх ячейки; В — дно ячейки; x — расстояние от оси вращения; t — время. Перед началом центрифугирования концентрация белка во всех точках ячейки одинакова, и $dc/dx=0$. Через время t_1 происходит частичная седиментация белка, и его концентрация увеличивается в направлении ко дну ячейки; в верхней части ячейки концентрация белка близка к нулю. Изменение c и dc/dx во времени при дальнейшем центрифугировании иллюстрируется соответствующими кривыми (t_2 , t_3 и t_4).

порциональна концентрации белка) от верхней границы раствора до дна кюветы. За положением границы между раствором белка и растворителем можно наблюдать также с помощью шлирен-оптики. При этом через кювету также пропускают свет и регистрируют изменение показателя преломления по высоте кюветы, которое пропорционально изменению концентрации белка. Изменение показателя преломления на границе растворителя и раствора белка регистрируется как градиент концентрации dc/dx (рис. 5.2). Если раствор содержит смесь веществ, частицы которых различаются по размеру, то на экспериментальной кривой наблюдается несколько пиков. Таким образом, возможно одновременно определять однородность образца по размеру частиц и молекулярную массу.

Частица, движущаяся с постоянной скоростью по окружности, обладает ускорением, направленным к центру этой окружности. Это ускорение равно $\omega^2 x$, где ω — угловая скорость вращения в радианах в секунду, а x — радиус окружности в сантиметрах. Произведение массы на ускорение дает силу F

$$F = V(\rho_2 - \rho_1)\omega^2 x = V\rho_2\omega^2 x - V\rho_1\omega^2 x$$

где V — объем частицы, а ρ_2 и ρ_1 — плотности частицы и растворителя соответственно (в граммах на миллилитр). Для 1 моля растворенного вещества

$$F = M\omega^2 x - \bar{v}\rho_1\omega^2 x = M\omega^2 x(1 - \bar{v}\rho_1)$$

где M — молекулярная масса растворенного вещества, а $\bar{v}$ — парциальный удельный объем в миллилитрах на грамм. Сила, проти-

действующая центробежной силе F , равна $f(dx/dt)$, где dx/dt — скорость седиментации, а f — молярный коэффициент трения. Тогда справедливо

$$f \frac{dx}{dt} = M\omega^2 x (1 - \bar{v}\rho_1)$$

Преобразуя это выражение, получаем

$$\frac{dx}{dt} \frac{1}{\omega^2 x} = M (1 - \bar{v}\rho_1) / f = s$$

где $\frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2 x}$ — скорость седиментации в единичном силовом поле, называемая коэффициентом седиментации s .

Решая полученное уравнение относительно M , получаем

$$M = fs / (1 - \bar{v}\rho_1)$$

Из этого уравнения нельзя рассчитать молекулярную массу, поскольку коэффициент трения f неизвестен и не может быть легко измерен. Однако f связан с коэффициентом диффузии D (см²/с):

$$D = RT/f$$

где R — газовая постоянная ($8,31 \cdot 10^7$ эрг·моль⁻¹·град⁻¹), а T — абсолютная температура в кельвинах. Таким образом, для молекулярной массы получаем

$$M = sRT/D (1 - \bar{v}\rho)$$

В этом уравнении все величины могут быть определены экспериментально, и, следовательно, можно вычислить молекулярную массу.

Коэффициент седиментации s имеет размерность времени, рассчитывается на единицу силы и обычно составляет $1 \cdot 10^{-13}$ — $200 \cdot 10^{-13}$ с. Единица измерения коэффициента седиментации называется сведбергом (сокращенно обозначается S); $1S = 1 \cdot 10^{-13}$ с.

Коэффициент диффузии можно определить путем наблюдения за уширением первоначально резкой границы между раствором белка и растворителем по мере того, как молекулы белка диффундируют в зону растворителя.

Скорость седиментации зависит от разности плотностей растворенных частиц и растворителя. Если частицы имеют меньшую плотность, чем растворитель, они всплывают (как сливки в сепараторе). Парциальный удельный объем $\bar{v}$ для большинства белков составляет 0,70—0,75 мл/г и зависит от аминокислотного состава; $\bar{v}$ можно вычислить, если последний известен, или определить экспериментально.

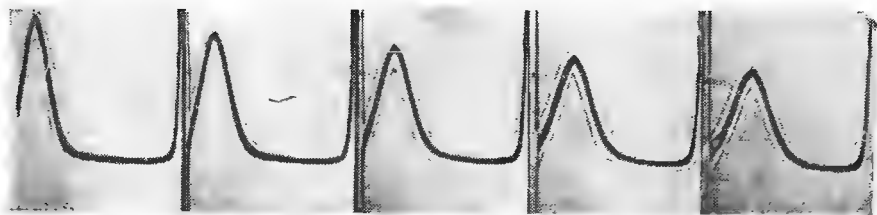


Рис. 5.3. Седиментация кристаллической рибонуклеазы в аналитической ультрацентрифуге при скорости вращения ротора 59 780 об/мин. Направление седиментации — слева направо. Первая фотография сделана через 1 ч после достижения установленной скорости; последующие — через каждые 16 мин. Обратите внимание на то, что по мере продвижения границы ко дну ячейки, высота пика уменьшается, а ширина увеличивается. Это явление обусловлено диффузией. Граница у дна ячейки соответствует осажденному белку. Если препарат содержит смесь белков или других веществ, молекулы которых различны по размерам, наблюдается серия пиков.

Белки с высокой степенью очистки образуют индивидуальные пики при ультрацентрифугировании. В качестве примера на рис. 5.3 приведены кривые седиментации, полученные с помощью шлирен-оптики. Ультрацентрифугирование является полезным при изучении стабильности белков, так как в различных условиях, например при экстремальных значениях pH или температуры, может происходить агрегация или диссоциация, что легко обнаруживается по изменению коэффициента седиментации. В табл. 5.1 приведены молекулярные массы некоторых белков, полученные с помощью седиментационного анализа. Современные методы позволяют определять молекулярные массы с погрешностью, не превышающей 5%.

5.1.2. Метод седиментационного равновесия

На практике коэффициенты седиментации можно определить достаточно точно. Определение же коэффициентов диффузии гораздо более трудоемко. Поэтому метод седиментационного равновесия, который не требует определения коэффициента диффузии, намного удобнее и более широко используется для установления молекулярных масс белков. В этом методе ультрацентрифугирование продолжают до тех пор, пока не будет достигнуто равновесное распределение изучаемого белка по всей длине ячейки. При равновесии не происходит видимого перемещения белка в ячейке, поскольку его движение ко дну ячейки под действием центробежной силы полностью уравновешивается движением вверх, обусловленным диффузией. Такое равновесное распределение характерно для каждого белка и зависит от его молекулярной массы. После дости-

жения равновесия можно измерить концентрацию белка по всей длине ячейки, используя оптическую систему, описанную выше для определения скорости седиментации. Уравнение для расчета молекулярной массы по методу седиментационного равновесия имеет следующий вид:

$$M = \frac{2RT \ln c}{\omega^2 x^2 (1 - \bar{v}\rho)}$$

где R , T , ω^2 , $\bar{v}$ и ρ уже определены выше, а c — концентрация белка на расстоянии x от оси вращения в ячейке ультрацентрифуги. Преобразуя это уравнение, получаем

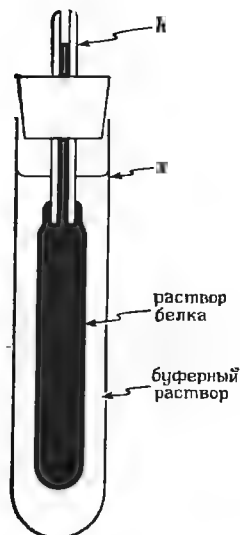
$$\ln c = M(1 - \bar{v}\rho)\omega^2 x^2 / 2RT$$

График зависимости $\ln c$ от x^2 — прямая, наклон которой равен $M(1 - \bar{v}\rho)\omega^2 / 2RT$. Поскольку c , x , $\bar{v}$, ρ , ω^2 , R и T легко измерить или рассчитать, M можно определить по наклону построенной прямой. Кроме того, молекулярная масса может быть рассчитана непосредственно для любой концентрации и соответствующего значения x , и если рассчитанное значение сохраняется постоянным в любой точке графика зависимости $\ln c$ от x^2 , то можно считать исследуемый белок гомогенным. В противном случае (белок гетерогенен) зависимость $\ln c$ от x^2 не линейна. Преимуществом описанного метода является также то, что для анализа можно использовать очень небольшие концентрации белка.

5.1.3. Седиментация в градиенте сахарозы

Принципиально возможно определение коэффициентов седиментации и, следовательно, *приблизительных молекулярных масс* даже не вполне индивидуальных белков, если имеется подходящий метод для измерения относительных концентраций белков, например путем измерения их ферментативной активности. Изучаемый образец осторожно наносится на раствор сахарозы с линейным градиентом концентрации и подвергается высокоскоростному центрифугированию в роторе с откидывающимися пробирками (в бакет-роторе). Обычно в качестве стандарта в раствор добавляется белок с известным коэффициентом седиментации s . Вещества с различными седиментационными свойствами отделяются в градиенте плотности друг от друга, образуя полосы. По окончании центрифугирования в нижней части центрифужной пробирки проделывают небольшое отверстие, фракции сливают и анализируют. Если фракции отбирают через различные промежутки времени центрифугирования, то временная зависимость расстояния от мениска до зоны белка, обладающего активностью, должна быть линейной. Для данного времени центрифугирования соблюдается следующая

Рис. 5.4. Схема простого осмометра. Осмотическое давление определяется разностью между высотой столба буферного раствора (x) и высотой столба раствора белка (h) в капилляре.



приблизительная закономерность, справедливая для веществ с почти сферической формой частиц и близкими значениями $\bar{v}$ (в качестве стандарта используется белок с известным коэффициентом седиментации s):

$$\frac{\text{расстояние от мениска до зоны неизвестного белка}}{\text{расстояние от мениска до зоны белка-стандарта}} = \frac{s_{20,w} \text{ неизвестного белка}}{s_{20,w} \text{ белка-стандарта}} = \left(\frac{M \text{ неизвестного белка}}{M \text{ белка-стандарта}} \right)^{2/3}$$

5.1.4. Осмотическое давление

Полупроницаемые мембраны, изготовленные из таких материалов, как коллоидий или целлофан, имеют поры, пропускающие молекулы воды и другие небольшие молекулы, но не пропускающие макромолекулы. Таким образом, если белок в буферном растворе поместить в мешочек из полупроницаемой пленки, а последний в свою очередь опустить в буферный раствор (рис. 5.4), то молекулы воды и буфера (но не молекулы белка) будут свободно проходить через мембрану как внутрь мешочка, так и из него. Вследствие наличия молекул белка концентрация (или, точнее, термодинамическая активность) молекул воды различна по разные стороны мембраны и перемещение молекул воды внутрь мешочка идет лучше, чем в обратном направлении. Этот процесс будет продолжаться до тех пор, пока эффективные концентрации воды по обе стороны мембраны не выравняются. В приборе, показанном на рис. 5.4, жидкость поднимается по капилляру, соединенному с диализным мешочком. *Осмотическое давление*, т. е. сила, заставляющая жидкость подниматься вверх по трубочке, измеряется такой высотой столбика жидкости в капилляре, которая достаточна для компенсации стремления раствора белка вытолкнуть присутствующие соли

через мембрану и поднять столбик жидкости выше. Осмотическое давление — свойство раствора в целом, оно является функцией общего числа растворенных частиц (ионов или молекул) в единице объема, но не зависит от их природы. Это свойство присуще раствору независимо от того, ограничен ли полупроницаемой мембраной или нет. Измеряемое экспериментально осмотическое давление в каждом частном случае зависит от свойств используемой мембраны. Осмотическое давление связано с молекулярной массой частиц следующим уравнением (которое аналогично уравнению состояния идеального газа):

$$\pi V = \frac{g}{M} RT$$

где π — осмотическое давление в атмосферах (1 атм = 760 мм ртутного столба), V — объем раствора белка в литрах, g — масса белка в граммах, M — молекулярная масса, R — газовая постоянная (0,082 л·атм·град⁻¹·моль⁻¹) и T — температура в кельвинах. Приведенное выше уравнение справедливо только в случае бесконечного разбавления, поэтому измерение проводится при нескольких концентрациях белка и M получают экстраполяцией к бесконечному разбавлению. Из уравнения следует, что чем больше экспериментальная масса белка, тем ниже осмотическое давление (в пересчете на 1 г вещества). Однако в действительности метод не применим к белкам с молекулярной массой, превышающей несколько сотен тысяч.

На осмотическое давление сильное влияние оказывают заряд белка и концентрация электролитов буфера. Вследствие того, что молекула белка заряжена, а по обе стороны мембраны должна поддерживаться электронейтральность, концентрации диффундирующих ионов по разные стороны мембраны могут различаться, что будет влиять на осмотическое давление. Однако этими эффектами можно пренебречь, если осмотическое давление измерять в изоэлектрической точке белка или же при значениях pH, отличающихся от изоэлектрической точки, но при высоких концентрациях электролитов. В настоящее время измерение осмотического давления с целью определения молекулярной массы используется редко. Экспериментально наблюдаемое осмотическое давление отражает среднюю молекулярную массу всех белков, присутствующих в растворе. Таким образом, только для чистых белков можно ожидать получения истинных значений молекулярной массы. В противоположность другим методам, имеющимся сейчас в распоряжении, этот метод совершенно не дает представления о гомогенности исследуемого препарата белка.

5.1.5. Определение молекулярной массы белков на основании их состава

Минимальная молекулярная масса $M_{\min}$ любого соединения может быть рассчитана из его элементного состава. Этот прием не применим для белков, состоящих из множества атомов C, H, N и O. Однако минимальные молекулярные массы некоторых белков, содержащих небольшое число атомов какого-либо элемента, могут быть установлены точно. Например, гемоглобин содержит 0,34% железа (атомная масса железа 55,8). Минимальная молекулярная масса, рассчитанная по формуле

$$M_{\min} = \frac{\text{атомная масса} \times 100}{\text{содержание элемента в масс. \%}}$$

равна 16 700. Для гемоглобинов такие значения были получены почти 100 лет назад; они послужили первым указанием на то, что молекулы белков крупнее, чем молекулы других органических соединений, известных в то время. Определенная позже действительная молекулярная масса гемоглобина оказалась равной ~ 65 000, т. е. молекула гемоглобина содержит четыре атома железа.

$M_{\min}$ может быть рассчитана подобным же образом, исходя из содержания остатков аминокислот, присутствующих в белке в небольших количествах. Например, бычий сывороточный альбумин содержит 0,58% триптофана (молекулярная масса триптофана 204,23). Отсюда $M_{\min}$ для этого белка равна 35 200, что составляет около половины действительной молекулярной массы, равной 69 000. Часто, однако, молекулы белков вообще не содержат таких редких атомов или аминокислотных остатков, которые можно было бы использовать для определения молекулярной массы. В этом случае целесообразно применение физических методов.

5.1.6. Фильтрация на молекулярных ситах

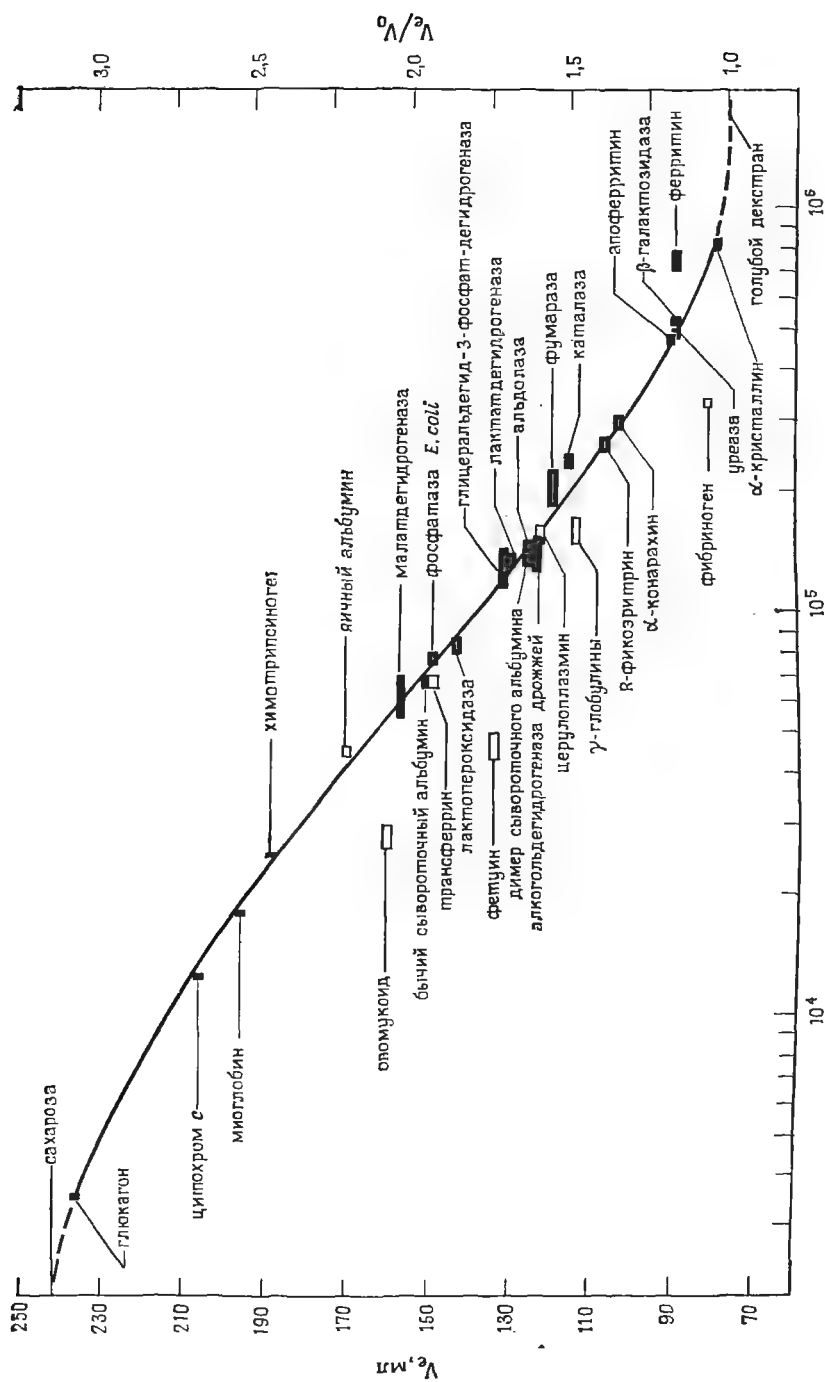
Определение молекулярных масс белков возможно также с помощью колоночной гель-проникающей хроматографии на полисахаридных или полиакриламидных гелях с поперечными сшивками (разд. 5.6.3.4). Этот метод, названный *гель-фильтрацией*, позволяет производить оценку гомогенности по размерам молекул, а также разделять белки с различными молекулярными массами. Зная объем элюирования изучаемого белка, можно оценить его величину, если колонка предварительно прокалибрована по белкам с известными молекулярными массами.

На рис. 5.5 приведен график зависимости объемов элюирования V_e различных белков от их молекулярной массы (молекулярные массы — в логарифмической шкале). Значения молекулярных масс большинства белков хорошо укладываются на приведенной на рисунке пологой кривой. Исключение составляют лишь некоторые белки с ярко выраженной асимметричной формой молекул, например фибриноген и овомукоид.

Таким же методом (рис. 5.5), но с использованием в качестве элюента 6 М гуанидингидрохлорида, можно довольно быстро определять молекулярные массы субъединиц белков. В этом растворе молекулы белков полностью теряют свою конформацию (гл. 6), и, таким образом, форма молекул не влияет на правильность определения молекулярной массы, как это имеет место в случае гель-фильтрации нативных белков. Отметим, что, прежде чем приступить к анализу белка данным методом, следует восстановить дисульфидные связи.

5.1.7. Гель-электрофорез и гель-фильтрация в присутствии додецилсульфата натрия

Белки под действием детергента додецилсульфата натрия (ДСН) денатурируют и диссоциируют на субъединицы. Инкубация белка в растворе ДСН при 100 °С в течение нескольких минут приводит к разворачиванию белковых молекул и связыванию с ними молекул ДСН (примерно одна молекула ДСН на каждые два аминокислотных остатка). Образовавшиеся комплексы содержат ~1,4 г ДСН на 1 г белка. Алифатические додецильные группы



Молекулярная масса

Рис. 5.5. Зависимость объема элюирования V_e от молекулярной массы белка при фракционировании на колонке со шитым декстраном (сефадекс G-200; колонка $2,5 \times 50$ см) при pH 7,5. Светлые прямоугольники соответствуют гликопротеинам. V_0 — свободный объем колонки. [Andrews P., Biochem. J., 96, 595, 1965.]

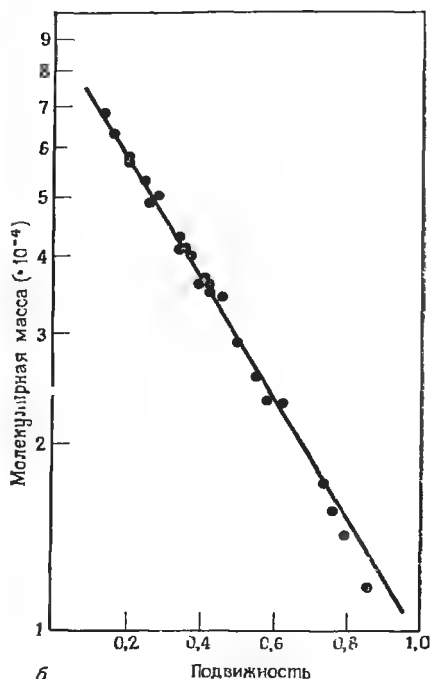
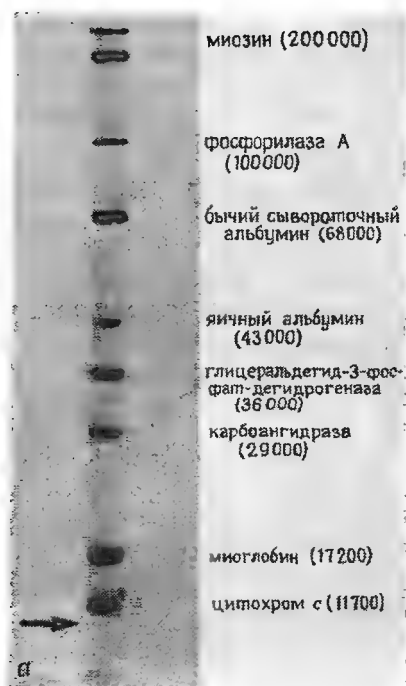


Рис. 5.6. Разделение смеси белков электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии ДСН. *а* — электрофорез смеси белков в фосфатном буферном растворе (рН 7,2), содержащем 0,2% ДСН; белки двигались сверху вниз; после электрофореза для обнаружения белковых зон гель окрашен красителем бриллиантовым голубым Кумасси. Название белка и его молекулярная масса указаны около соответствующей зоны. *б* — подвижности 24 белков (относительно подвижности красителя, принятой за 1) при ДСН-электрофорезе в полиакриламидном геле в зависимости от молекулярной массы (от 11 700 до 68 000): наибольшей подвижностью обладает цитохром *с*, а наименьшей — сывороточный альбумин. [Weber K., Osborn M., p. 180, in Neurath H., Hill R. L., eds., *The Proteins*, vol. II, Academic Press, Inc., New York, 1975.]

располагаются внутри комплекса, тогда как сульфокислотные — на поверхности. Суммарный отрицательный заряд такого комплекса намного превышает заряд боковых цепей аминокислотных остатков белка. Комплексы ДСН — белок имеют палочкообразную форму с диаметром $\sim 1,8$ нм и длиной пропорциональной молекулярной массе полипептидной цепи. И такие комплексы обладают примерно одинаковым отрицательным зарядом, приходящимся на единицу массы, и, следовательно, при зональном электрофорезе (разд. 5.6.4) в гелях с однородной пористостью мигрируют со скоростью, обратно пропорциональной молекулярной массе. На

рис. 5.6 приведен типичный образец геля, на котором с помощью электрофореза было проведено разделение смеси белков, а также дана логарифмическая зависимость подвижности от молекулярной массы. Если в белках имеются дисульфидные связи, то их следует предварительно восстановить. Некоторые белки, например белки с высоким содержанием углеводов, при анализе данным методом ведут себя аномально. Метод имеет также широкое применение для оценки сложных смесей мембранных белков и определения их молекулярной массы, поскольку мембранные белки, например белки мембран эритроцитов, плохо растворимы (гл. 32).

Кроме того, молекулярные массы белков можно определять с помощью гель-фильтрации, подобно тому как описано выше (рис. 5.5), но используя в качестве растворителя водный раствор ДСН.

5.2. Форма белковых молекул

Зная константу седиментации и коэффициент диффузии D , можно рассчитать величину относительного трения

$$f/f_0 = 10^{-8} [(1 - \bar{v}\rho)/(D^2 s \bar{v})]^{1/2}$$

где все обозначения совпадают с введенными выше (разд. 5.1.1). Величина f_0 представляет собой молярный коэффициент трения компактной сферической и негидратированной частицы. При $f/f_0 = 1,0$ форма молекулы близка к негидратированной сфере. При $f/f_0 > 1,0$ молекулы могут быть гидратированы или асимметричны или одновременно и гидратированы, и асимметричны. Молекулы многих глобулярных белков, по-видимому, имеют сферическую или близкую к сферической форму. К таким белкам относятся рибонуклеаза, инсулин, химотрипсин, пепсин. Однако молекулы многих других белков явно асимметричны и существуют в растворе в виде вытянутых эллипсоидов или палочек. Белок плазмы крови — фибриноген, являющийся предшественником фибрина при образовании тромба, а также миозин, основной белок мышечных волокон, представляют собой вытянутые эллипсоиды. Установлено, что молекула фибриногена человека имеет в поперечнике 3,8 нм, а ее длина составляет 70 нм. Растворы таких молекул проявляют ярко выраженную способность к рассеянию света, и поэтому форма молекул, а также их молекулярная масса могут быть определены с помощью измерения рассеяния света.

Вязкость раствора при данной концентрации растворенного вещества зависит от молекулярной массы и формы молекул этого вещества. Белки, молекулы которых резко асимметричны, обладают большей характеристической вязкостью, чем белки с такой же молекулярной массой, но со сферической формой молекул. Если

известна молекулярная масса, то по изменению вязкости в зависимости от концентрации растворенного вещества можно оценить форму молекул.

5.3. Амфотерные свойства

Белки, как и аминокислоты, являются амфолитами и мигрируют в электрическом поле со скоростью, зависящей от их суммарного заряда и рН среды. При определенном для каждого белка значении рН его молекулы оказываются электронейтральными. Это значение рН называют *изоэлектрической точкой* и обозначают pI ; некоторые типичные величины pI приведены в табл. 5.1. Изоэлектрическая точка белка зависит от числа и природы заряженных групп в молекуле. Белковая молекула заряжена положительно, если рН среды ниже pI , и отрицательно, если рН среды выше pI .

Число ионизованных групп в белке можно определить с помощью титрования от изоэлектрической точки кислотой или основанием; кривая титрования гемоглобина лошади (рис. 5.7) типична для глобулярных белков. В табл. 5.2 приведены характерные значения pK ионизованных R-групп белков. Точное значение pK отдельной ионизованной группы данного белка может несколько отличаться от значения, указанного в табл. 5.2 и зависящего от электростатического окружения этой группы. Например, каждая из γ -карбоксильных групп белка может иметь несколько отличное от других значение pK , но вместе эти группы дают при титровании кажущееся значение pK , приблизительно равное 4,4. Влияние локального окружения проявляется в экстремальных значениях pK

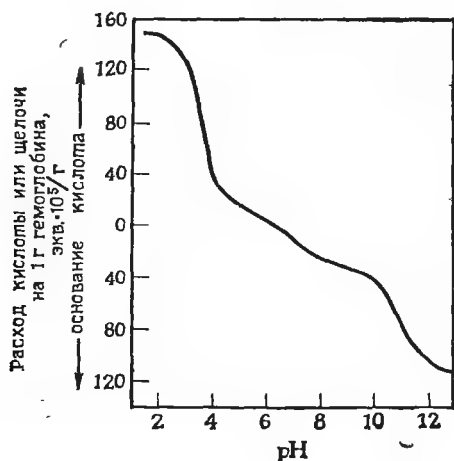


Рис. 5.7. Кривая титрования кристаллического гемоглобина лошади. [Cohn E. J., Green A. A., Blanchard M. H., J. Am. Chem. Soc., 59, 590, 1937.]

Таблица 5.2

Характерные значения pK кислотных и основных групп белков

Группа	pK_a при 25 °C	Экстремальные значения pK
α -Карбоксильная (концевая)	3,0—3,2	1—6,8
β -Карбоксильная (аспарагиновая кислота)	3,0—4,7	1—6,8
γ -Карбоксильная (глутаминовая кислота)	~4,4	1—6,8
Имидазольная (гистидин)	5,6—7,0	5,6—7,5
α -Аминогруппа (концевая)	7,6—8,4	7,3—>12
ϵ -Аминогруппа (лизин)	9,4—10,6	7,3—>12
Гуанидиновая (аргинин)	11,6—12,6	11,5—12,6
Фенольный гидроксил (тирозин)	9,8—10,4	9,4—>12
Сульфгидрильная (цистеин)	~8—9	8—9,5

некоторых ионизованных R-групп, которые также приведены в табл. 5.2.

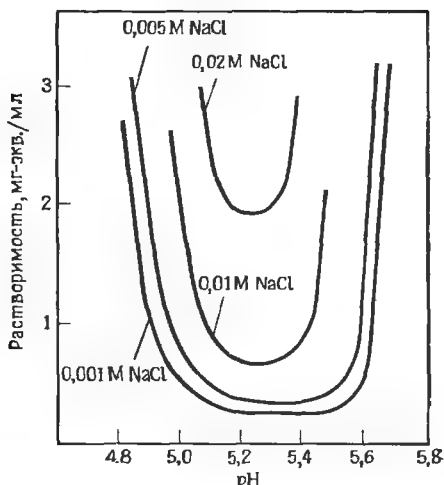
Как амфолиты, белки связывают и катионы, и анионы. Специфическое связывание белками небольших ионов, например иона Ca^{2+} , играет важную роль в физиологических процессах. Некоторые органические и неорганические вещества легко осаждают белки из растворов. К таким веществам относятся трихлоруксусная, пикриновая, фосфовольфрамовая кислоты, а также ионы тяжелых металлов, такие, как Hg^{2+} и Ba^{2+} . Многие нативные белки являются металлопротеинами (конъюгированными белками); они специфически связаны с ионами Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} и Fe^{3+} в координационные комплексы с участием различных ионизованных групп.

5.4. Растворимость

Каждый белок обладает определенной растворимостью, зависящей от природы самого белка и состава растворителя. На растворимость существенное влияние оказывает pH среды. Обычно растворимость минимальна в изоэлектрической точке (рис. 5.8). Вероятно, это происходит вследствие того, что в изоэлектрической точке силы электростатического отталкивания минимальны, а силы, способствующие формированию кристаллической решетки, максимальны. При отклонении pH в любую сторону от pI белки приобретают положительный или отрицательный заряд, а их растворимость увеличивается.

Присутствие солей в растворе может либо увеличить, либо уменьшить растворимость белка. Увеличение растворимости бел-

Рис. 5.8. Растворимость β -лактоглобулина в зависимости от pH среды при четырех различных значениях ионной силы.



ков в присутствии солей называют *солевым растворением* (рис. 5.8). Растворимость является функцией ионной силы раствора, которую, зная молярную концентрацию и заряд присутствующих ионов, легко рассчитать по уравнению

$$\mu = \frac{1}{2} \sum mZ^2$$

где μ — ионная сила, m — молярность, а Z — заряд иона. Знак суммирования Σ означает, что величины mZ^2 , соответствующие каждому иону, складываются. Ионная сила растворов солей однозарядных ионов равна их молярности, а ионная сила, например, 0,1 M раствора Na_2SO_4 равна

$$\mu = \frac{1}{2} (0,2 \cdot 1^2 + 0,1 \cdot 2^2) = 0,3$$

Растворимость любого вещества зависит от относительного сродства молекул растворенного вещества друг к другу (по типу сродства при образовании кристаллической решетки) и к молекулам растворителя. Любой фактор, снижающий взаимодействие молекул растворяемого вещества, будет способствовать его растворению. При солевом растворении малые ионы нейтральных солей взаимодействуют с ионными группами белковых молекул, снижая тем самым белок-белковое взаимодействие и, следовательно, увеличивая растворимость.

Высокие концентрации нейтральных солей приводят к осаждению белков из водных растворов. Это явление называют *высаливанием*. Двух- и трехзарядные ионы более эффективны в этом смысле, чем однозарядные (рис. 5.9). Обычно для высаливания используют Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, соли магния и фосфаты. Высаливание:

наиболее эффективно в изоэлектрической точке белка. Влияние ионной силы на растворимость карбоксигемоглобина показано на рис. 5.9. Высаливание может происходить не только в случае с белками, но также и с газами, незаряженными молекулами и электролитами. Механизм этого процесса сложен. Ионы соли притягивают поляризованные молекулы воды, уменьшая тем самым количество воды, взаимодействующей с белком, поскольку при высоких концентрациях солей количество ионов соли огромно по сравнению с заряженными группами белков. А так как растворимость белков в воде зависит от образования гидратной оболочки вокруг гидрофильных ионных групп, перемещение молекул воды к другим ионам снижает растворимость белка. Влияние солей на растворимость белков и аминокислот в качественном отношении аналогично.

Белки осаждаются также из водных растворов неполярными растворителями, смешивающимися с водой. С этой целью обычно используют метанол, этанол и ацетон. На растворимость белков в этих растворителях существенно влияют нейтральные соли. Наиболее удовлетворительных результатов достигают тогда, когда все операции проводят при низких температурах, т. е. в условиях, при которых белки наиболее стабильны.

5.5. Очистка белков

Многие методы очистки белков принципиально подобны методам, применяемым для очистки других веществ, представляющих биологический интерес. Однако одно из основных требований,

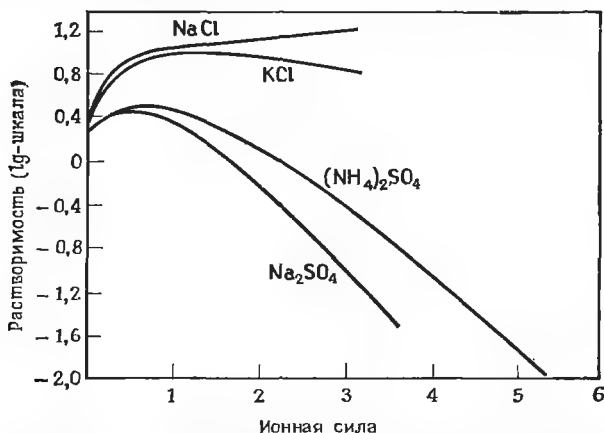


Рис. 5.9. Растворимость карбоксигемоглобина лошади в солевых растворах различной ионной силы. Имеет место как солевое растворение, так и высаливание. [Cohn E. J., Edsall J. T., *Proteins, Amino Acids, and Peptides as Ions and Dipolar Ions*, Reinhold Publishing Corporation, New York, 1942.]

предъявляемых к такого рода методам, заключается в необходимости переведения изучаемого белка в раствор. Даже если известна детальная структура белка, точно предсказать его растворимость невозможно. Вот почему подбор условий очистки белков производится во многом эмпирически, а растворение, являющееся первой стадией очистки, может быть достигнуто только путем опробывания известных методик. Обычно при этом поддерживают температуру около 4°C и стараются избегать экстремальных pH, хотя известны и исключения. Многие белки, присутствующие в различных клеточных структурах, могут образовывать ассоциаты с другими веществами, например с липидами, превращающими эти белки в нерастворимые в воде. Исходную ткань измельчают, добываясь разрушения клеток и обеспечивая тем самым наиболее полное проникновение в них растворителя. Белки часто экстрагируются водой или растворами солей с небольшой ионной силой. Они также могут быть солюбилизированы с помощью слабых растворов детергентов, а также с помощью неполярных растворителей, например ацетона или эфира, удаляющих липиды, или бутанола, разрушающего клеточные структуры.

Для дальнейшего разделения растворенных белков часто используют различия в их растворимости. Большие количества балластных белков или выделяемый белок можно осадить из раствора путем изменения условий, влияющих на растворимость, а именно концентрации солей, pH или концентрации органического растворителя. Часто оказывается эффективным ступенчатое увеличение концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Глобулярные белки растворимы в 1 М (25% концентрации насыщенного раствора) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и осаждаются при увеличении концентрации этого раствора до 5,3 моль/л (насыщенный раствор). Можно подобрать такую концентрацию соли (например, 40% концентрации насыщенного раствора), при которой выделяемый белок еще находится в растворе, в то время как другие белки, нерастворимые в этих условиях, осаждаются и могут быть отделены центрифугированием. Затем концентрацию соли увеличивают (например, до 60% концентрации насыщенного раствора) с тем, чтобы нужный белок выпал в осадок, а другие белки остались в растворе. Далее выделяемый белок может быть подвергнут очистке другими методами (описанными в последующих разделах), применяемыми для выделения многих других веществ биологического происхождения.

5.6. Методы разделения и очистки биологически активных веществ

Традиционные методы органической химии, такие, как перегонка, кристаллизация и возгонка, неприменимы для очистки большинства компонентов живой материи, и поэтому для них были раз-

работаны специальные методы. Проблемы, с которыми приходится сталкиваться при выделении чистых биохимических компонентов, будут рассмотрены ниже. Вещество, подлежащее очистке, должно быть отделено от других компонентов смеси, которая обычно содержит несколько тысяч различных видов молекул, имеющих молекулярную массу от 10^2 до 10^8 и присутствующих в концентрациях от 10^{-15} до 10^{-2} моль/л. Выделяемые вещества зачастую неустойчивы; поэтому их не следует подвергать воздействию pH, температуры или давления в их экстремальных значениях. За исключением ряда липидов и некоторых других веществ, большинство веществ биологического происхождения плохо растворяется в органических растворителях, и, следовательно, их очистка должна производиться в водных растворах. Кроме того, в каждом классе биомолекул имеется много подобных друг другу соединений, отличающихся очень незначительно. Например, глицин является одной из 20 аминокислот, обнаруженных в белковых гидролизатах, и его основные свойства подобны свойствам других α -аминокислот. Поэтому были разработаны селективные методы высокого разрешения, применимые для разделения микроколичеств веществ. Эти же методы во многих случаях используются в весьма чувствительных и количественных аналитических тестах, а также для установления чистоты вещества.

5.6.1. Принципы и классификация методов очистки

Методы, разработанные для разделения биологически активных веществ, во многих отношениях очень сходны между собой и могут рассматриваться как составляющие единого *каскада*. Характерным свойством каскадного процесса является прохождение смеси веществ через ряд последовательных стадий очистки. Проведя одну стадию очистки, можно добиться лишь частичного разделения составных частей смеси; по мере того как смесь подвергается дальнейшему разделению с использованием сотен, а иногда и тысяч различных стадий, отдельные ее компоненты выделяются и тем самым достигается высокая степень их очистки. Изменения, происходящие от стадии к стадии при разделении смеси с помощью каскадного метода очистки, схематически показаны на рис. 5.10. Можно предположить, что молекулы разделяемых веществ в смеси движутся по каналу, диаметр которого мал по сравнению с его длиной; пространство в канале, не занятое этими молекулами, заполнено растворителем. Молекулы веществ в смеси подвергаются действию силы F_1 , вызывающей их движение по каналу и действующей одинаково на каждую молекулу; однако другая сила F_2 действует в противоположном направлении и задерживает молекулы. Если силы торможения для разных молекул в смеси различны, то при прохождении по достаточно длинному каналу начинается их

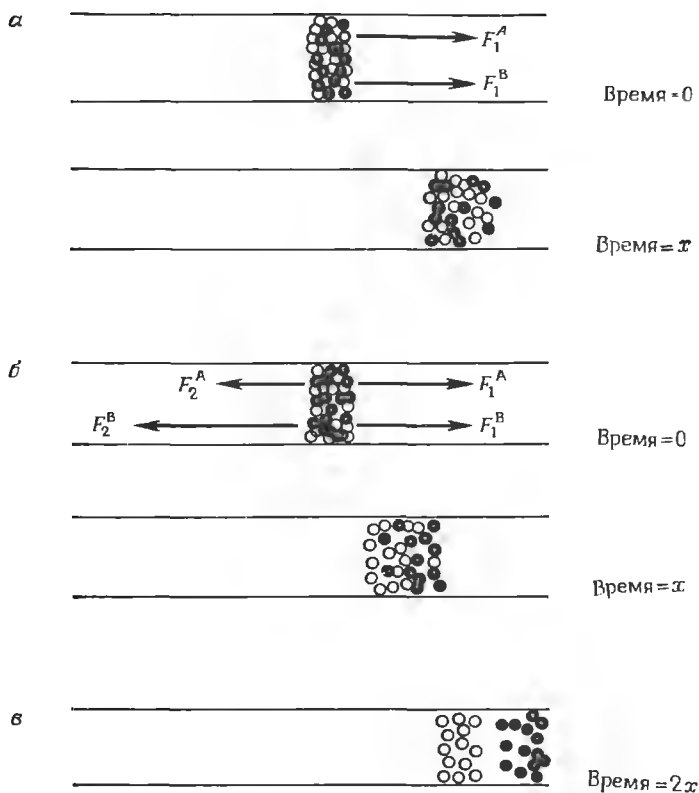


Рис. 5.10. Принцип каскадного метода разделения смеси веществ. Раствор двух веществ А (темные кружочки) и В (светлые кружочки) помещен в специальный канал, площадь сечения которого мала по сравнению с его длиной. Если смесь движется вдоль канала под влиянием постоянной силы F_1 , действующей на А и В одинаково, то скорости движения компонентов равны и разделения, как такового, не происходит (а). Если же задерживающая сила F_2 неодинаково действует на А и В, то при движении вдоль канала вещество А отделяется от В (б). Скорость движения компонентов А и В зависит от $\Delta F^A = F_1^A - F_2^A$ и $\Delta F^B = F_1^B - F_2^B$ соответственно, поэтому достигаемое разделение определяется соотношением $\Delta F^A / \Delta F^B$. Поскольку вещества А и В находятся под действием постоянных сил, то их разделение будет все более полным по мере прохождения вдоль канала, и наконец, по истечении времени $2x$ достигается полное их разделение (в). Произвольно малую длину канала можно рассматривать как одну стадию процесса разделения, а весь канал — как серию стадий. Таким образом, вещества А и В подвергаются каскадному методу разделения.

разделение. Продолжая этот процесс, можно добиться полного разделения компонентов смеси. Как угодно малую длину канала можно рассматривать в качестве отдельной стадии каскадного процесса.

В табл. 5.3 перечислены некоторые обычные каскадные методы разделения смесей биохимических веществ, а также проведена классификация каждого метода на основании природы движущей и задерживающей сил, действующих при разделении. Методы ультрацентрифугирования, описанные выше, также принадлежат к каскадным методам.

5.6.2. Противоточное распределение

Разберем в качестве примера типичного каскадного метода разделения процесс противоточного распределения. Этот метод заключается в повторяемом распределении смеси растворенных веществ между двумя несмешивающимися растворителями в серии пробирок или делительных воронок, в которых несмешивающиеся фазы находятся в контакте. Для иллюстрации использования этого метода рассмотрим поведение растворенного вещества при последовательном распределении между двумя несмешивающимися жидкостями в нескольких делительных воронках. Распределение вещества между двумя несмешивающимися растворителями определяется его коэффициентом распределения K_p :

$$K_p = \frac{\text{концентрация вещества в верхней фазе}}{\text{концентрация вещества в нижней фазе}}$$

При $K_p = 1$ после растворения вещества в любом из двух растворителей и после тщательного перемешивания фаз количество вещества в верхней и нижней фазах будет одинаковым (при условии, что объемы фаз одинаковы). При последовательном переносе вещества в следующие делительные воронки с соблюдением принципа противотока (рис. 5.11) будет достигаться новое распределение между верхней и нижней фазами в каждой воронке. В этом процессе нижняя фаза остается неподвижной и потому так и называется *неподвижной фазой*, тогда как верхняя переносится и называется *подвижной фазой*. По завершении определенного числа переносов вещество будет распределено по ряду пробирок в зависимости от его коэффициента распределения и числа переносов. Таким образом, при 100-кратном переносе вещества с коэффициентом распределения 1 максимальное количество этого вещества будет сконцентрировано в 50-й пробирке, все более уменьшаясь в обе стороны от этой пробирки, так что реальное распределение этого вещества будет соответствовать распределению Пуассона, как показано на рис. 5.11, б. Вещества с $K_p < 1$ будут распределяться в пробирках 1—50, а вещества с $K_p > 1$ — в пробирках 50—100.

Каждая пробирка в приборе для противоточного распределения может рассматриваться как отдельная стадия каскадного процесса разделения, в котором растворенные вещества переносятся от одной стадии к другой механически (движущая сила F_1) и задерживаются в зависимости от их коэффициентов распределения (задерживающая сила F_2). Два соединения с различными коэффициентами распределения могут быть разделены после достаточного числа переносов, причем число таких переносов зависит от абсолютной разности коэффициентов распределения. Для разделения веществ с незначительно отличающимися коэффициентами распределения (например, 0,05 и 0,1) потребуется гораздо больше переносов, чем для разделения веществ с большей разностью K_p .

В настоящее время противоточное распределение широко применяется в биохимии, хотя и не является столь общепринятым, как другие каскадные ме-

Таблица 5.3
Классификация методов разделения^a

Метод	Движущая сила F_1	Задерживающая сила F_2	Факторы, влияющие на разделение
Противоточное разделение	Механическая	Силы, определяющие характер распределения между фазами	Растворимость в несмешивающихся растворителях
Хроματοграфия			
Адсорбционная	Гидродинамическая	Поверхностная энергия адсорбции	Структурные особенности разделяемых веществ и адсорбентов
Распределительная жидкостная	»	Силы, определяющие характер распределения между фазами	Растворимость в несмешивающихся жидкостях
Распределительная газожидкостная	Механическая	То же	Растворимость газообразных веществ в жидкой фазе
Ионообменная	Гидродинамическая	Электростатическая	Ионная природа ионообменных веществ
Гель-фильтрация	»	Силы, определяющие характер распределения между фазами растворителя внутри и вне гелевого носителя	Различия в размерах и форме молекул
Аффинная	»	Нековалентные взаимодействия	Специфические взаимодействия растворенных веществ с адсорбентом
Электрофорез			
В свободном растворе	Электростатическая	Молекулярное трение	Ионные свойства
В пористых средах (зональный электрофорез)	»	»	»
В пористых средах в присутствии детергентов	»	»	Молекулярные массы

^a Из книги Morris C. I.O.R., *Separation Methods in Biochemistry*, Pitman Publishing Corporation, New York, 1976.

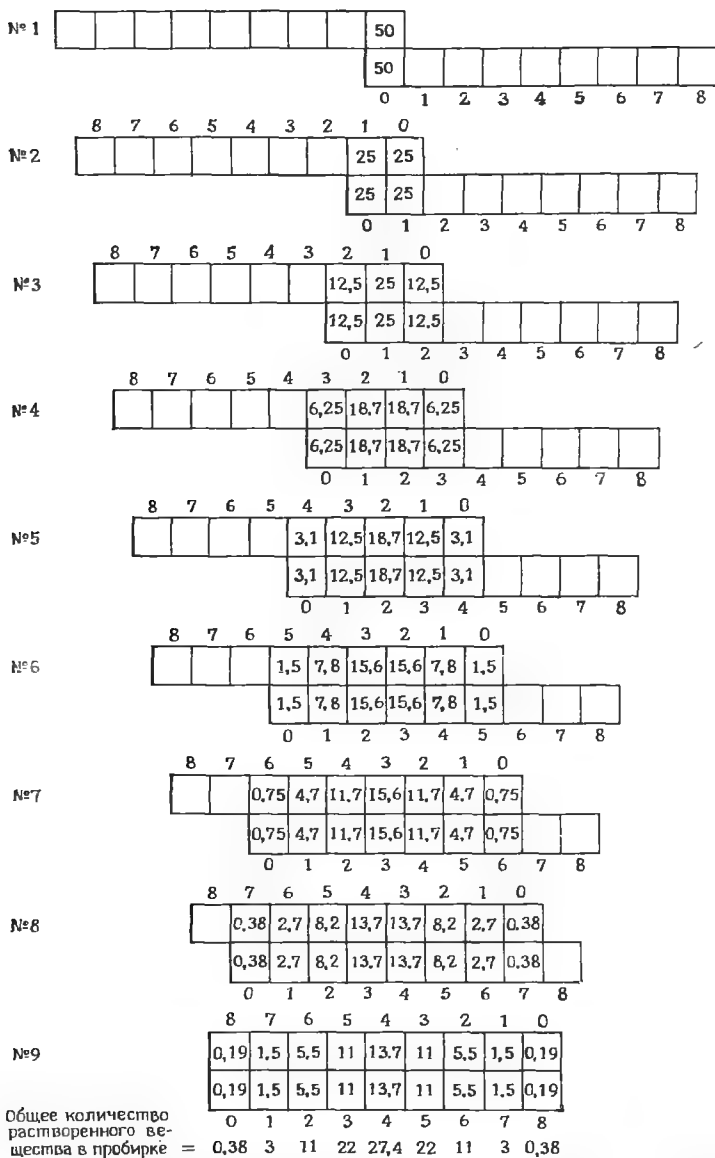


Рис. 5.11. Противоточное распределение вещества с $K_p=1,0$ между равными объемами двух несмешивающихся жидкостей. а — первая стадия: 100 мг вещества помещают в пробирку № 0; фазы перемешивают и оставляют до полного разделения. Поскольку $K_p=1$, то в обеих фазах будет по 50 мг вещества. Вторая стадия (первый перенос в системе с противотоком): верхняя фаза пробирки № 0, содержащая 50 мг вещества, переносится в пробирку № 1 со свежей нижней фазой, а нижняя фаза пробирки № 0 переносится в пробирку со свежей верхней фазой. Фазы снова перемешиваются и отстаиваются до разделения. Каждая верхняя и нижняя фазы на этой стадии содержат 25 мг вещества. Стадии 3—9 осуществляются аналогичным образом.

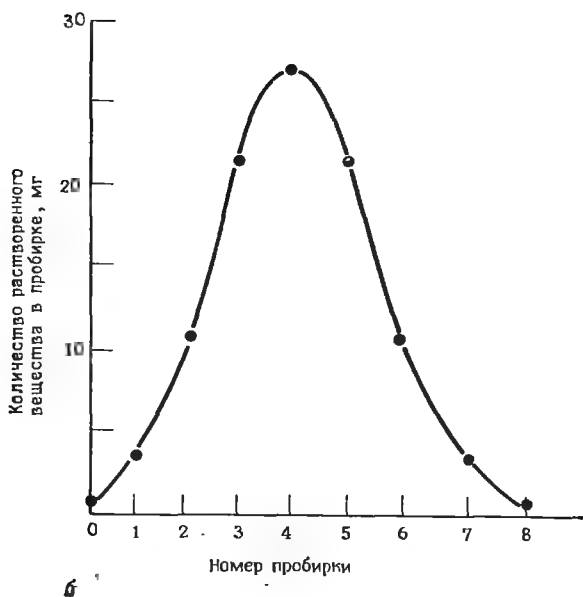


Рис. 5.11 (продолжение). б — конечное суммарное количество вещества в каждой пробирке (в верхней и нижней фазах).

тоды. Тем не менее по сравнению с другими каскадными методами этот метод наиболее эффективен для разделения граммовых количеств веществ. Кроме того, в продаже имеются установки, содержащие от 50 до 2000 ячеек, в которых каждый перенос пробы осуществляется автоматически. На рис. 5.12 представлены результаты разделения этим методом смеси органических кислот.

5.6.3. Хроматография

Термин «хроматография» в настоящее время применяется для обозначения любого метода разделения, заключающегося в пропускании смеси растворенных веществ через пористый твердый носитель, независимо от природы сил, способствующих разделению (рис. 5.13). Ввиду того, что используется очень много разнообразных хроматографических методов, стоит рассмотреть принципиальную основу каждого метода в отдельности.

5.6.3.1. Адсорбционная хроматография

Разделение смесей цветных пигментов растительного происхождения на различных твердых адсорбентах впервые описано в 1903 г. Обнаружено, что экстракты зеленых листьев содержат два зеленых пигмента (хлорофиллы *a* и *b*), а также несколько желтых пигментов (каротиноидов). Метод был назван хроматографией [*chroma* (греч.) — цвет и *graphein* (греч.) — пишу]. Адсорбци-

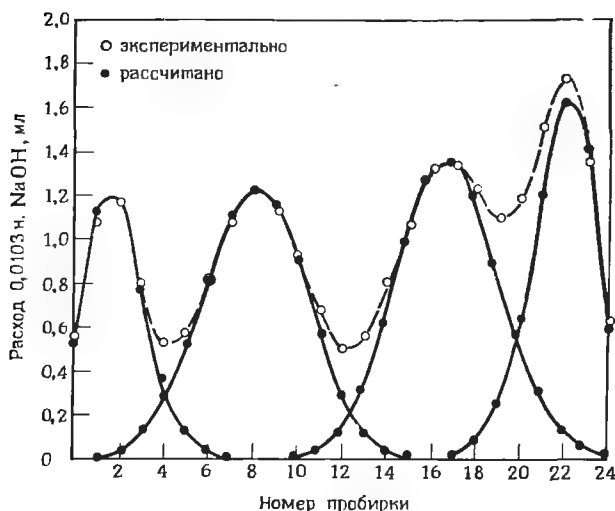


Рис. 5.12. Противоточное распределение смеси четырех органических кислот. Пики слева направо соответствуют уксусной, пропионовой, масляной и валериановой кислотам. Содержание кислоты в каждой пробирке определялось путем титрования раствором едкого натра. [Craig L. C., Craig D., p. 171, in: *Technique of Organic Chemistry*, vol. 3, Interscience Publishers, Inc. New York, 1950.]

онная хроматография на таких веществах, как древесный уголь, оксид алюминия, диатомитовые земли и силикагель, широко используется для разделения многих типов веществ. Разделение определяется различиями в адсорбции веществ на поверхности определенных адсорбентов, осуществляемой посредством дипольных взаимодействий, водородных связей, а также гидрофобных взаимодействий.

5.6.3.2. Распределительная хроматография

Этот каскадный метод был разработан в процессе поиска простого метода противоточного распределения. Рассуждение строилось следующим образом: если неподвижную фазу закрепить на твердом инертном носителе в цилиндрической колонке, а подвижную фазу пропускать через колонку в условиях равновесия с неподвижной фазой, смесь растворенных веществ будет разделяться по мере того, как подвижная фаза будет проходить через колонку. Первоначально в качестве твердого носителя использовали силикагель, который насыщали водой, содержащей индикатор метилоранж, а в качестве подвижной фазы — хлороформ, насыщенный водой. Было обнаружено, что, если N-ацетильные производные аминокислот растворить в небольшом объеме подвижной фазы, нанести на такую колонку, а затем пропускать через нее подвижную фазу, то эти производные движутся с разными скоростями. N-Ацетильные производные аминокислот — достаточно сильные кислоты и меняют цвет метилоранжа; поэтому они образуют в колонке красные полосы на желтом фоне, как показано на рис. 5.13, и их движение хорошо заметно. Каждую фракцию собирали по мере выхода из колонки. С помощью этого метода нельзя разделить все N-ацетил-аминокислоты, однако при использовании нескольких систем растворителей и различных колонок ряд производных удалось выделить в виде препаратов вы-

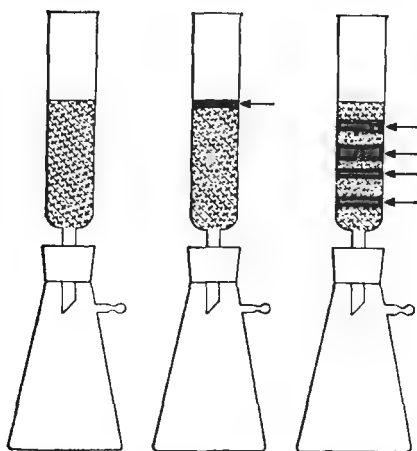


Рис. 5.13. Принципиальная схема простейшего типа хроматографии. Прежде всего готовят колонку с подходящим адсорбентом (слева). Раствор, содержащий смесь четырех веществ, наносят сверху на колонку и дают ему медленно «впитаться» в нее под действием силы тяжести или небольшого разрежения, созданного в колбе. При этом смесь адсорбируется в виде узкой полосы в верхней части колонки (в центре). При пропускании элюента через колонку сверху вниз смесь разделяется, а поскольку вещества окрашены, то в колонке появляются четыре дискретные зоны (справа).

сокой чистоты. Основной механизм разделения на такой колонке заключается в распределении ациламино кислот между неподвижной (вода) и подвижной (хлороформ) фазами, как и в случае противоточного распределения; при этом небольшой отрезок колонки эквивалентен одной стадии противоточного распределения. Хотя некоторая адсорбция на силикагеле и влияет на подвижность кислот, метод был назван *жидкостной хроматографией*.

Затем в качестве твердого носителя для разделения модифицированных аминокислот стали использовать фильтровальную бумагу. *Хроматография на бумаге*, единственный широко применяемый в биохимии вид жидкостной хроматографии, является одним из наиболее эффективных аналитических методов разделения. Полоску фильтровальной бумаги, на которую недалеко от верхнего конца нанесено некоторое количество смеси аминокислот, насыщают водной неподвижной фазой и помещают в камеру, насыщенную парами обеих фаз; верхний конец полоски опускают в лодочку, содержащую подвижную фазу, и закрепляют в ней. Подвижная фаза под действием капиллярных сил поступает из лодочки и движется далее вниз по полоске бумаги. Индивидуальные аминокислоты перемещаются вниз по бумаге с различными скоростями, зависящими от их коэффициентов распределения для данной пары фаз (по аналогии с противоточным распределением или колоночной жидкостной хроматографией). Порядок движения аминокислот по бумаге различен в разных растворителях, и ни один из применяемых растворителей не позволяет произвести полное разделение всех 20 аминокислот, но, используя хроматографирование в двух перпендикулярных направлениях (рис. 5.14), можно добиться полного их разделения. Аминокислоты можно обнаружить, опрыскивая бумагу раствором нингидрина, что приводит к появлению синеватых окрашенных пятен аминокислот. Описанная методика соответствует *нисходящей бумажной хроматографии*. Иногда в

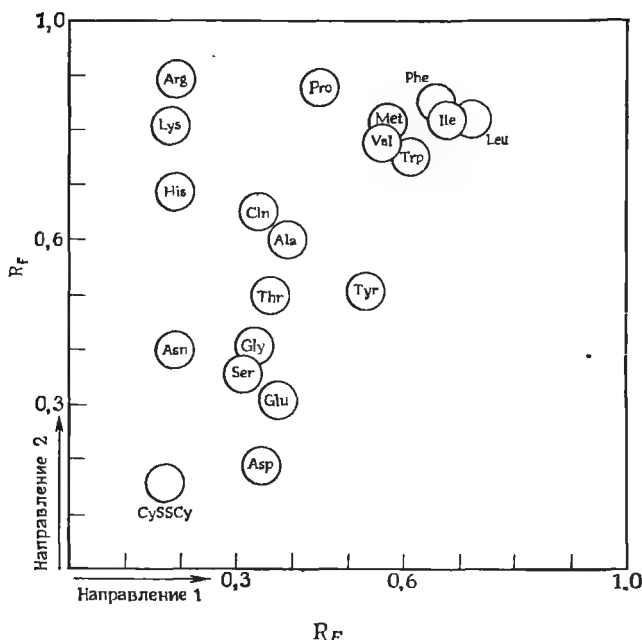


Рис. 5.14. Разделение смеси аминокислот с помощью двумерной хроматографии на бумаге. В первом направлении использована смесь растворителей *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (250:60:250 по объему), а во втором направлении — смесь фенол — вода — аммиак (120:20:0,3%). R_F фронта растворителей в обоих направлениях принято равным 1. Сокращения названий аминокислот см. табл. 4.1.

одном или в обоих направлениях вполне успешно применяется *восходящая бумажная хроматография*.

Жидкостная распределительная хроматография на бумаге используется для разделения очень многих типов веществ, включая простые углеводы, липиды, нуклеотиды и пептиды. Кроме того, разработаны различные модификации этого метода, в которых целлюлоза заменена синтетическими полимерами, кремнеземом, окисью алюминия или производными целлюлозы. Для проведения хроматографии могут быть использованы самые разнообразные растворители. В одной из разновидностей этого метода, называемой *тонкослойной хроматографией*, смесь веществ разделяется с помощью восходящей хроматографии на твердом носителе, нанесенном равномерным тонким слоем на стеклянную или пластмассовую пластинку.

Другой метод распределительной хроматографии — *газожидкостная хроматография* — особенно пригоден для разделения легколетучих веществ. Первоначально применение этого метода ограничивалось разделением летучих углеводов и жирных кислот, однако сейчас он используется и для разделения летучих производных липидов, моносахаридов, аминокислот, стероидов и других веществ, представляющих биологический интерес.

В газожидкостной хроматографии стеклянная или металлическая колонка длиной 1—2 м и диаметром 0,2—1 см заполняется тонкоизмельченными частицами инертного твердого носителя (например, диатомитовая золь или огнеупорный кирпич), пропитанными нелетучими жидкостями (смазочными или силиконовыми маслами либо полиэфирами высокомолекулярных спиртов и двух-

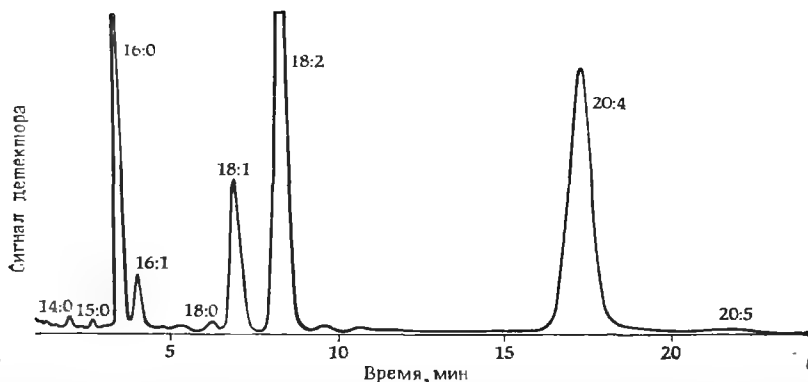


Рис. 5.15. Газожижкостное хроматографическое разделение метиловых эфиров жирных кислот, присутствующих в нормальной плазме крови крысы в виде эфиров холестерина. Цифры у пиков указывают число атомов углерода (первая цифра) и число двойных связей в данной кислоте (вторая цифра). Площади пиков пропорциональны относительным количествам жирных кислот в смеси. (С любезного разрешения д-ра Л. Гайдеза).

основных кислот). В колонке по всей ее длине поддерживается повышенная температура (170—225 °С); смесь анализируемых летучих веществ вводится в верхнюю часть колонки и быстро там испаряется. Пары веществ проходят через колонку, увлекаемые равномерным потоком инертного газа, например аргона, гелия или азота. Компоненты смеси движутся по колонке с различными скоростями в зависимости от коэффициентов распределения между газом (подвижная фаза) и нелетучей жидкостью (неподвижная фаза). Наличие разделяемых веществ в потоке газа, выходящего из колонки, обычно обнаруживается физическими или химическими средствами. Результаты автоматически записываются на диаграммной ленте в виде серии пиков. Площадь каждого пика пропорциональна концентрации соответствующего компонента смеси. Идентификация компонентов на хроматограмме осуществляется с помощью стандартов. Проведенное таким образом разделение смеси метиловых эфиров жирных кислот представлено на рис. 5.15. Для идентификации членов гомологического ряда, например метиловых эфиров насыщенных жирных кислот с неразветвленной цепью, строят график зависимости времени, необходимого для элюирования данного соединения (времени удерживания), от числа атомов углерода в молекуле. Газожижкостная хроматография позволяет проводить количественное разделение и анализ нанogramмовых количеств смесей многих веществ.

5.6.3.3. Ионообменная хроматография

В этом каскадном методе раствор, содержащий смесь ионов, наносится на колонку с подходящим нерастворимым носителем, несущим фиксированные заряженные группы и находящимся в равновесии с водным буферным раствором. Затем через колонку под действием гидростатического давления (движущая сила) пропускается буферный раствор. Разделение происходит вследствие ионных взаимодействий (задерживающая сила) между растворенными веществами и носителем. Движение ионов вниз по колонке определяется природой носителя, свойствами разделяемых ионов и растворителя.

Применяются несколько типов носителей (ионитов), включая синтетические смолы, целлюлозу, декстран или агарозу, в которые введены катионные или

анионные группы. Смолы, связывающие катионы, называются *катионообменными* или *катионитами*, а связывающие анионы — *анионообменными* или *анионитами*. В табл. 5.4 перечислены некоторые типичные иониты, производимые промышленностью.

Таблица 5.4
Некоторые широко применяемые иониты

Катионит		Анионит	
Полимерный носитель	Функциональная группа	Полимерный носитель	Функциональная группа
Сульфированный полистирол с поперечными связями	$-\text{SO}_3\text{H}$	Триэтиламинополистирол с поперечными связями	$-\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_3$
Полиметакриловая кислота с поперечными связями	$-\text{COOH}$	Диметил(оксиметил)аминополистирол с поперечными связями	$-\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_2$ $\quad \quad \quad \text{CH}_2-\text{OH}$
Фосфоцеллюлоза	$-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}$	Диэтиламиноэтилцеллюлоза	$-(\text{CH}_2)_2-\text{N} \begin{cases} \text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{cases}$
Карбоксиметилцеллюлоза	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	Диэтил(2-оксипропил)аминоэтилендекстран	$-(\text{CH}_2)_2-\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$ $\quad \quad \quad \downarrow$ $\quad \quad \quad \text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3$ $\quad \quad \quad \quad \quad \downarrow$ $\quad \quad \quad \quad \quad \text{OH}$
Сульфопропилдекстран	$-(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3\text{H}$		

Принцип ионного обмена иллюстрирует схема на рис. 5.16, где рассмотрено взаимодействие двух гипотетических веществ RH^+ и QH^+ с катионитом, содержащим функциональные сульфогруппы. Прежде всего ионит промывают большим объемом буферного раствора, содержащего равные концентрации слабой кислоты НВ ($\text{pK}=4$) и ее натривой соли (Na^+B^-), причем pH раствора равен 4, а концентрация ионов Na^+ 0,1 моль/л. Полученную таким способом смолу (в Na -форме) переносят в колонку в том же буфере (pH 4). Вещества RH^+ и QH^+ являются слабыми кислотами; каждое из веществ имеет одну кислотную группу ($\text{pK}_\text{p}=6$ и $\text{pK}_\text{q}=7$). Если RH^+ и QH^+ растворить в небольшом объеме буфера с pH 4 и нанести на колонку, уравновешенную тем же буфером, то RH^+ и QH^+ будут замещать ионы натрия на катионите. После завершения этого процесса RH^+ и QH^+ окажутся в неподвижной фазе, т. е. на нерастворимом катионите. RH^+ и QH^+ очень прочно связываются с катионитом в данных условиях (pH 4 и $[\text{Na}^+]=0,1$ моль/л). Связывание может быть ослаблено изменением концентрации Na^+ или pH раствора. Если буферный раствор подщелачивать до pH 6, соединение RH^+ начнет частично диссоциировать, образуя R , которое плохо связывается с обменником. При еще более щелочных pH будет образовываться Q , также плохо связывающееся с носителем. Напротив, если значительно увеличить концентрацию Na^+ , например от 0,1 до 0,5 моль/л, подерживая pH 4, то как RH^+ , так и QH^+ будут менее прочно связываться со смолой, поскольку большее число ионов Na^+ окажется способным конкурировать

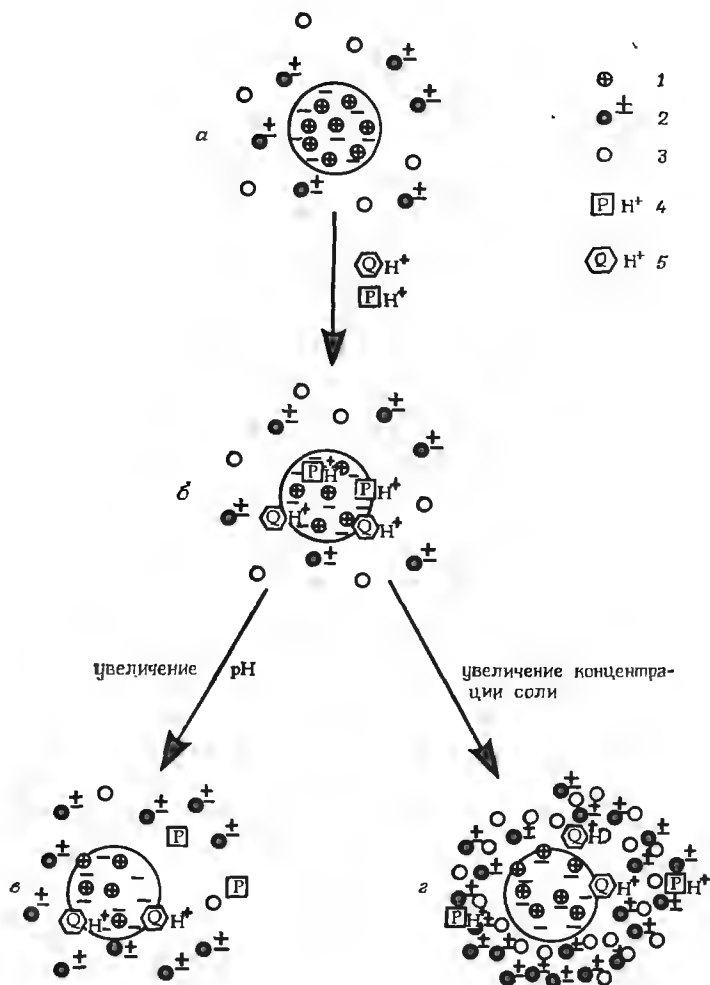


Рис. 5.16. Принципиальные особенности ионного обмена. Частица катионообменной смолы изображена в виде большой окружности. *a* — смола имеет фиксированные отрицательные заряды и находится в Na^+ -форме. Ионы Na^+ (1), связанные со смолой, быстро обмениваются с катионами натриевой соли (2) слабой кислоты НВ (3); *б* — соединения RNH^+ (4) и QH^+ (5), добавленные в систему, обмениваются с ионами натрия и оказываются связанными со смолой; *в* — средство RNH^+ к смоле снижено увеличением pH до 6, т. е. до pK RNH^+ ; *г* — средство RNH^+ к смоле ослабляется также при увеличении концентрации Na^+ .

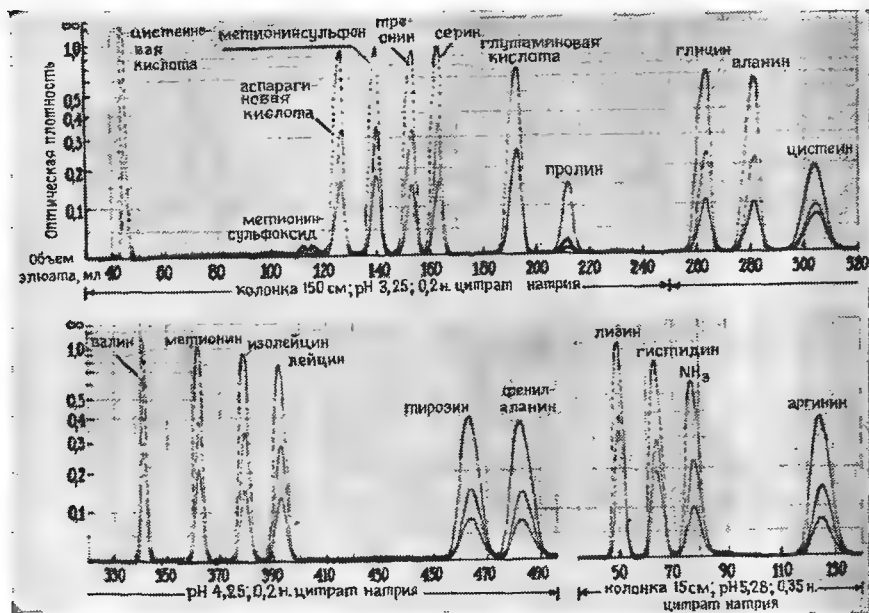


Рис. 5.17. Автоматическая запись результатов хроматографического анализа стандартной смеси аминокислот на сульфированной полистирольной смоле. [Spackman D. H., Stein W. H., Moore S., Anal. Chem., 30, 1190, 1958.]

вать за сульфогруппы смолы. Следовательно, для того, чтобы разделить Р и Q в этой системе, нужно приготовить буфер с такими рН и концентрацией Na^+ , чтобы RH^+ и QH^+ имели различное сродство к нониту, тогда при пропускании смеси RH^+ и QH^+ через колонку произойдет разделение. Другие факторы, такие, как температура и присутствие органических растворителей, также влияют на хроматографическое поведение смесей ионных соединений. Очевидно, что подобный механизм процесса ионного обмена имеет место и на анионитах; только в этом случае фиксированные катионные группы носителя связывают анионы.

Ионообменная хроматография широко используется для разделения биомолекул. Примером, свидетельствующим о ее высокой разрешающей способности, является приведенная на рис. 5.17 картина разделения аминокислот. Для разделения требуются две колонки: одна (150 см) для кислых, нейтральных и ароматических аминокислот, а другая (15 см) для основных аминокислот. Очевидно, что удерживание аминокислот зависит от их основности. Поэтому аспарагиновая и глутаминовая кислоты выходят с колонки раньше большинства нейтральных аминокислот и, естественно, значительно опережают выход основных аминокислот. В этом случае легко могут быть разделены даже нейтральные аминокислоты, поскольку, несмотря на близкие значения pK , их неполярные боковые цепи обладают различным сродством к смоле. В системе, представленной на рис. 5.17, элюат, выходящий из колонки, автоматически смешивается с раствором нингидрина; при прохождении аминокислоты с нингидрином через нагревательную ячейку появляется окрашивание, интенсивность которого

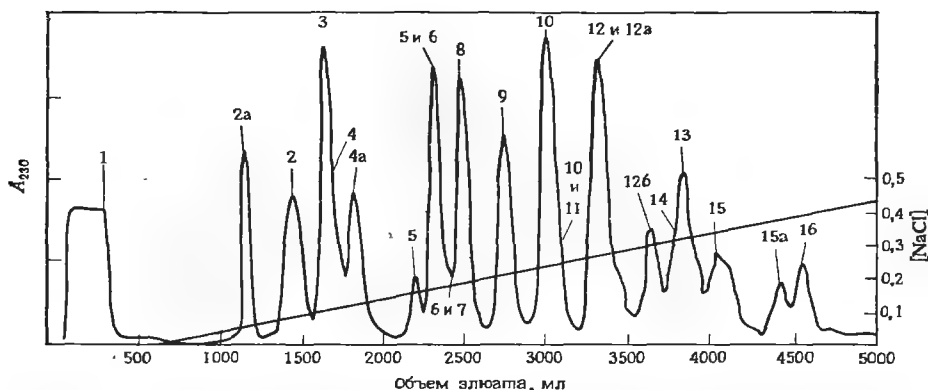


Рис. 5.18. Хроматографическое разделение смеси белков 30S-субъединицы рибосомы *E. coli* (гл. 26). Смесь нанесена на колонку (2,8×60 см) с фосфоцеллюлозой, уравновешенной фосфатным буфером (рН 6,5), содержащим 6 М мочевию. Затем через колонку со скоростью 45 мл/ч пропущен буферный раствор с линейным градиентом концентрации NaCl от 0 до 0,6 моль/л. Фракции элюата собирались автоматически, концентрация белка определялась по поглощению при длине волны 230 нм (A_{230}). Некоторые пики содержали индивидуальные белки; пики, обозначенные более чем одним номером, представляли собой смеси белков. [Hardy S. J. S., Kurland C. G., Voynow P., Nova G., Biochem., 8, 2897, 1967.]

определяется фотометрически. Изменение фототока с изменением объема элюата автоматически записывается самописцем на диаграммной ленте. Определение площадей пиков позволяет проводить анализ смесей количественно. Идентификация отдельных аминокислот осуществляется довольно просто, поскольку в контролируемых условиях параметры выхода с колонки постоянны для каждой аминокислоты. Все эти принципы были использованы при конструировании аминокислотных анализаторов.

Разделение смеси аминокислот, приведенное на рис. 5.17, является примером ионообменной хроматографии при постоянной концентрации Na^+ и трех различных значениях рН. Часто оказывается невозможным точно подобрать необходимые условия для удовлетворительного разделения неизвестной смеси ионов. По этой причине во многих случаях разделение на ионите проводят с помощью градиентного элюирования, при котором состав буферного раствора, поступающего в колонку, изменяют постепенно (либо относительно концентрации неорганического иона, участвующего в обмене с функциональными группами смолы, либо относительно рН), что приводит к изменению сродства растворенных веществ к иониту. На рис. 5.18 в качестве примера использования градиентного элюирования приведена картина разделения смеси белков.

5.6.3.4. Гель-проникающая хроматография (гель-фильтрация)

В этом виде хроматографии вещества разделяют в соответствии с размерами и формой их молекул. Если гранулы различных пористых нерастворимых материалов, таких, как синтетические смолы, пористое стекло или полисахариды (декстран или агароза), суспендировать в подходящем растворителе, то образуются две фазы растворителя (одна внутри, а другая вне гранул), как показано схематически на рис. 5.19. Колонка, наполненная такими гранулами, дей-

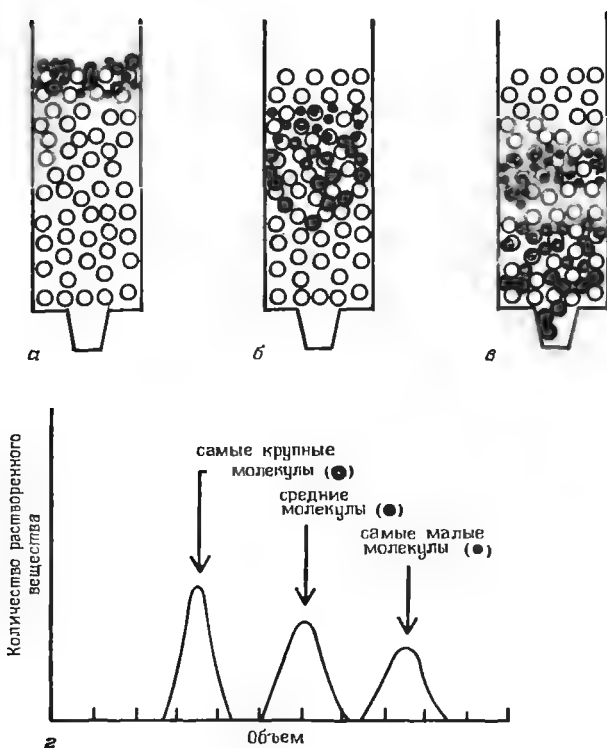


Рис. 5.19. Схематическое изображение процесса разделения трех веществ с различными молекулярными массами с помощью гель-фильтрации. Молекулы наименьшего размера могут свободно входить во внутреннее пространство частиц геля; более крупные молекулы также могут войти внутрь частицы, но не столь легко, как первые. Самые крупные молекулы неспособны проникать внутрь геля. Светлые кружочки — частицы геля. *a* — смесь нанесена на колонку; *b* — процесс разделения прошел наполовину; *в* — самые крупные молекулы начинают выходить с колонки; *г* — кривые элюирования, полученные путем измерения концентрации вещества в каждой фракции собранного элюата после завершения хроматографии. Если V_0 — объем растворителя между частицами геля, а V_s — объем доступного растворителя внутри геля, то объем элюирования V_e (объем, с которым данное вещество выходит с колонки) равен $V_e = V_0 + KV_s$ (K — коэффициент распределения вещества между подвижной фазой V_0 и неподвижной фазой V_s). Для веществ, не способных проникать в гель, $V_e = V_0$, поскольку для них $K = 0$. Для веществ, способных входить в гель, $V_e > V_0$; $V_e = V_0 + V_s$ для молекул, свободно проникающих в гель ($K = 1$).

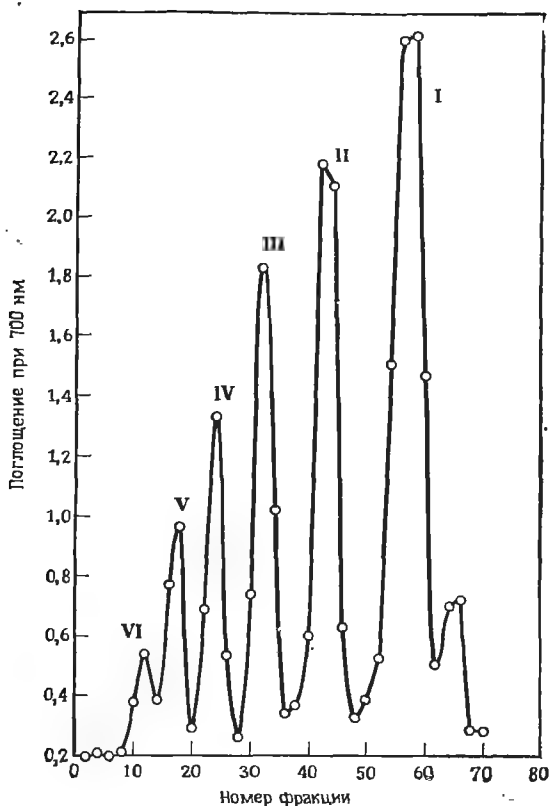


Рис. 5.20. Гель-фильтрация смеси олигосахаридов N-ацетилглюкозамина. Смесь олигосахаридов в 0,1 M NaCl нанесена на колонку; скорость элюирования 600 мл/ч. Объем каждой фракции 125 мл. Римские цифры у пиков указывают число остатков N-ацетилглюкозамина в соответствующем углеводе (например, I — N-ацетилглюкозамин, VI — хитогексоза). [Raftery M. A., Rand-Meir T., Dahlquist F. W., Parsons S. M., Borders C. L., Wolcott R. G., Beranek W., Jao L., *Anal. Biochim.*, 30, 429, 1969.]

ствует как молекулярное сито, поскольку молекулы небольших размеров распределяются между обеими фазами, тогда как более крупные молекулы не могут проникнуть во внутреннюю фазу. Гранулированный материал можно подвергнуть химической обработке с целью получения определенной пористости и, таким образом, приблизительно определить молекулярные массы веществ, способных проникать внутрь гранул носителей. В табл. 5.5 приведены некоторые широко применяемые в гель-проникающей хроматографии молекулярные сита с указанием оптимальной области молекулярных масс.

Если на колонку с носителем, размеры пор которого исключают проникновение во внутреннюю фазу веществ с молекулярной массой выше заданной, нанести смесь растворенных веществ с различными молекулярными массами, то вещества с размерами молекул меньше заданного проникают во внутреннюю

Таблица 5.5
Некоторые носители, применяемые
при гель-фильтрации

Тип носителя	Молекулярные массы веществ, неспособных проникать во внутреннюю фазу носителя
Декстран	$\begin{matrix} >700 \\ >1\,500 \\ 1\,000-5\,000 \\ 1\,500-30\,000 \\ 4\,000-150\,000 \\ 5\,000-400\,000 \end{matrix}$
Агароза	$\begin{matrix} 1 \cdot 10^3-4 \cdot 10^6 \\ 5 \cdot 10^3-20 \cdot 10^6 \\ 20 \cdot 10^6-40 \cdot 10^6 \end{matrix}$

фазу и отделяются от более высокомолекулярных (см. рис. 5.19). Некоторые вещества с незначительно отличающимися молекулярными массами могут быть легко отделены друг от друга; например, моно-, ди- и трисахариды легко отделяются от более высокомолекулярных олигосахаридов, как показано на рис. 5.20. Понятно, что способность молекулы проникать во внутреннюю фазу зависит как от молекулярной массы, так и от формы молекулы, а в случае макромолекул форма часто оказывает такое же существенное влияние на реальный объем удерживания, как и их размер. Асимметричные молекулы могут оказаться неспособными проникать во внутреннюю фазу, легко доступную сферическим молекулам такого же размера, и поэтому могут элюироваться с колонки меньшим объемом, чем сферические молекулы.

5.6.3.5. Аффинная хроматография

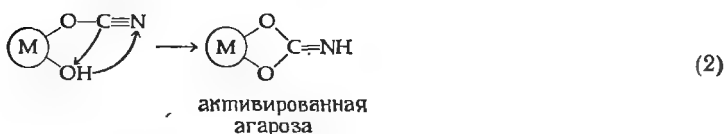
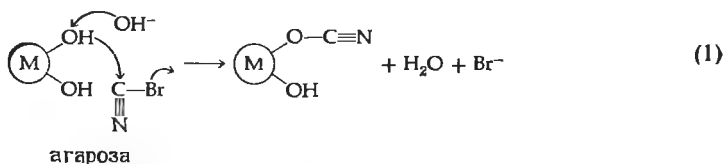
Аффинная хроматография используется для выделения таких белков, как ферменты, иммуноглобулины, лектины, рецепторные белки, которые обладают способностью специфически связываться с другими веществами. Несмотря на то что этот метод разработан сравнительно недавно, он уже оказал мощное влияние на развитие методологии очистки белков. Принцип метода состоит в следующем: лиганд L , который обладает способностью специфически связываться с выделяемым белком, прочно закрепляют на нерастворимом носителе M . Полученный таким образом адсорбент ML суспендируют в подходящем растворителе и переносят в хроматографическую колонку. Затем через колонку пропускают смесь, содержащую выделяемый белок. Белок P связывается со специфическим адсорбентом благодаря нековалентным взаимодействиям:



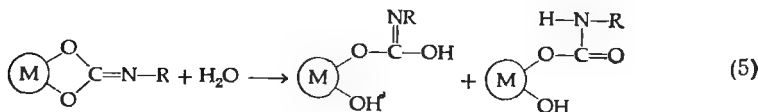
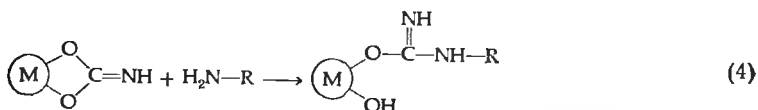
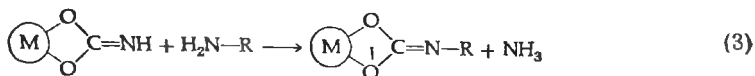
Если данная смесь не содержит других белков, способных связываться с иммобилизованным лигандом, то все белки, кроме P , пройдут вниз по колонке не задерживаясь. После тщательной промывки колонки связанный белок элюируют раствором, вызывающим диссоциацию специфического комплекса, т. е. сдвигают равновесие в приведенной выше реакции влево.

Химическая природа лиганда зависит от природы выделяемого белка и способа закрепления лиганда на носителе. Если разделяют смесь ферментов, то лиганд должен быть структурно подобен либо субстратам, либо продуктам

ферментативной реакции, либо конкурентным ингибитором, поскольку специфичность связывания в этом случае обеспечивается за счет взаимодействия лиганда с активным центром фермента. Для антитела лиганд должен быть структурно родственен его антигену, для лектинов — специфическим сахарам, а для рецепторных белков — рецептируемым веществам. Основная проблема в создании подходящего лиганда заключается в необходимости его закрепления на носителе химическим способом, поэтому до тех пор, пока не были разработаны общие методы «привязывания» лигандов к декстранам и агарозам, аффинная хроматография не имела практического значения. При щелочных рН бромидиан реагирует с декстранами и агаразами, обычно используемыми для гель-фильтрации, а образующиеся производные ковалентно связываются с первичными и вторичными аминами. Считается, что реакция бромидиана со свободными гидроксидными группами агароз происходит следующим образом (M — гранулы агарозы):



«Активированная агароза» затем взаимодействует с аминами:



Были также разработаны другие методы привязывания лигандов к различного типа матрицам, но активация агарозы бромцаном с последующим присоединением аминов остается наиболее широко используемым и гибким методом приготовления специфических адсорбентов для аффинной хроматографии. Агарозы с привязанными лигандами довольно стабильны и обладают отличными характеристиками как носители для колоночной хроматографии. Поэтому, если у специфического лиганда отсутствует аминогруппа, то ее вводят искусственно.

Поскольку белки содержат свободные аминогруппы, они легко привязыва-

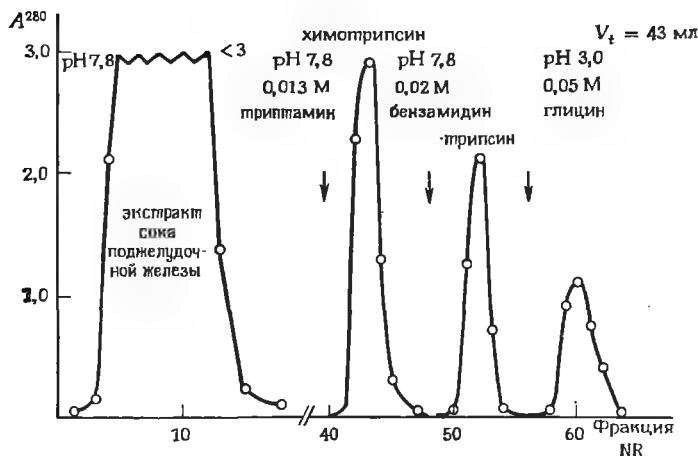
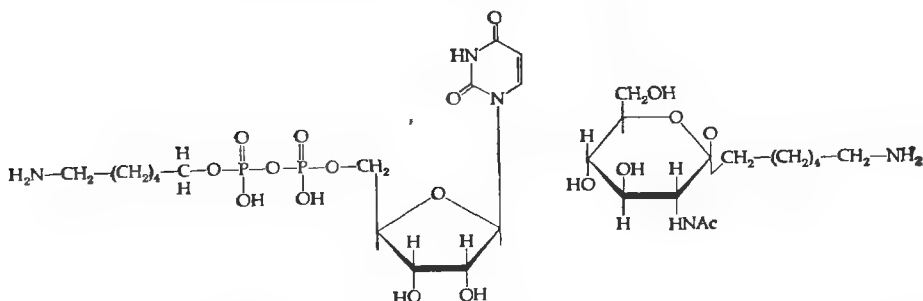


Рис. 5.21. Выделение химотрипсина и трипсина из сока поджелудочной железы путем одностадийного специфического связывания с ингибитором обоих ферментов. Фракция NR, вышедшая с колонки после элюирования раствором с pH 3, не содержала ни трипсина, ни химотрипсина и представляла собой белки, неспецифически связанные с помощью ионных взаимодействий с ингибитором из соевых бобов. Такое связывание часто имеет место при аффинной хроматографии, поскольку многие лиганды имеют ионную природу и аффинные адсорбенты ведут себя как ионообменники. Таким образом, специфическое элюирование ингибиторами дает более высокоочищенные ферменты, чем неспецифическая десорбция путем изменения ионной силы или pH. [Porath G., Kristiansen T., pp. 95—175, in: H. Neurath, R. L. Hill, eds., *Proteins*, vol. I, Academic Press, Inc., New York, 1975.]

ются к активированной агарозе. Агароза, к которой привязан белок — ингибитор трипсина, выделяемый из соевых бобов, является превосходным специфическим адсорбентом трипсина и химотрипсина (рис. 5.21). Оба фермента связываются с этим ингибитором в соке поджелудочной железы в условиях их каталитической активности, поэтому очень вероятно, что взаимодействие с ингибитором происходит специфически. В аффинной хроматографии адсорбцию белков обычно осуществляют в условиях, благоприятствующих максимальному специфическому связыванию. После того как большинство белков сока поджелудочной железы выйдет, не задерживаясь, из колонки, химотрипсин специфически элюируют буферным раствором, содержащим ингибитор этого фермента — триптамин. Затем раствором, содержащим бензамидин (ингибитор трипсина, но не химотрипсина), элюируют трипсин. Триптамин и бензамидин являются специфическими десорбентами этих ферментов, поскольку они также связываются с их активными центрами и, следовательно, способны вытеснить отсюда соевый ингибитор трипсина. Привязывание белков к агарозе нашло широкое применение для выделения других белков; например, специфические антитела на какой-либо белок-антиген адсорбируют на агарозе с привязанным антигеном, а затем десорбируют их, промывая колонку раствором с высокой ионной силой или низким pH.

В настоящее время более чем для 100 ферментов уже получены специфические адсорбенты, представляющие собой ковалентно пришитые к агарозе синтетические низкомолекулярные ингибиторы или субстраты. Например, гексанол-аминные производные UDP и N-ацетилглюкозамина, структуры которых приведены ниже, способны связываться с агарозой, активированной бромцанном,

образуя различные, но в равной мере эффективные адсорбенты для галактозил-трансферазы, катализирующей реакцию (гл. 15)



Следует обратить внимание на то, что в обоих случаях лиганд отделен шестью метиленовыми звеньями от аминогруппы, реагирующей с агарозой. Эти звенья образуют так называемую «ножку», роль которой заключается в том, чтобы отдалить лиганд от поверхности агарозы с целью устранения стерических препятствий для связывания фермента. Известно много случаев, когда для получения эффективного аффинного адсорбента требовалась даже более длинная «ножка».

5.6.4. Электрофорез

Ранее уже отмечалось, что белковые молекулы перемещаются в электрическом поле (при любом pH, кроме изоэлектрической точки). Методы, основанные на этом свойстве белковых молекул, широко используются при изучении смесей белков. По кривой титрования белка можно составить представление о суммарном электрическом заряде молекулы при любом pH. Так как скорость перемещения молекулы в электрическом поле в значительной степени определяется ее суммарным зарядом, электрофоретическая подвижность белка зависит от pH, как, впрочем, и степень ионизации молекулы. На рис. 5.22 приведены электрофоретическая подвижность и кривая титрования кристаллического яичного альбумина. Хотя форма и размеры молекулы оказывают влияние на абсолютную скорость перемещения в электрическом поле, определяющим фактором является все же суммарный заряд.

Поскольку белки значительно различаются по изоэлектрическим точкам и кривым титрования, они различаются также по электрофоретической подвижности при любом данном pH. Электрофоретический анализ используется для определения чистоты индивидуальных белков, а также для количественного анализа сложных смесей.

В экспериментальном отношении электрофорез довольно несложен. Белок в буферном растворе с определенным pH помещают

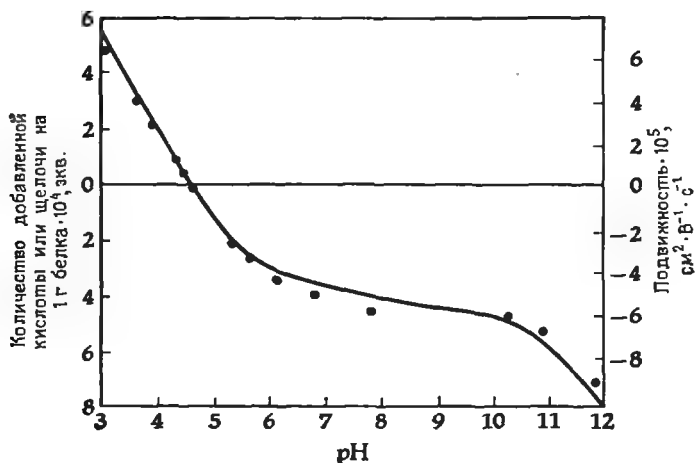


Рис. 5.22. Электрофоретическая подвижность (точки) и кривая титрования кристаллического яичного альбумина. (Данные по подвижности взяты из работы [Longsworth L. C., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **41**, 275, 1941]; кривая титрования взята из работы Cannan R. K., Kibrick A., Palmer A. H., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **41**, 243, 1941].)

на дно U-образной трубки. Непосредственно на образец белка на-
слаивают буферный раствор, не нарушая границы между ними.
В буфер опускают электроды, а U-образную трубку погружают в
баню, в которой поддерживается постоянная температура около
 0°C . Это делается для того, чтобы уменьшить конвекционные токи,
которые могут возникать при выделении тепла, а также для пред-
отвращения тепловой коагуляции термочувствительных белков.
В современных электрофоретических приборах применяются U-об-
разные трубки с плоскими оптически прозрачными поверхностями.
Эти приборы сконструированы таким образом, что введение раство-
ров в систему и температурное уравнивание осуществляются
без нарушения границы между буфером и раствором белка. Скор-
ость движения молекул белка в электрическом поле определяется
путем измерения временной зависимости перемещения фронта бел-
ка в растворителе. За перемещением зоны окрашенного белка мож-
но легко наблюдать визуально. Но поскольку большинство белков
бесцветны, разработаны специальные оптические системы, подоб-
ные применяемым при ультрацентрифугировании (разд. 5.1.1), поз-
воляющие следить за изменением показателя преломления раство-
ра в электрофоретической ячейке. Зафиксированные различия
значений показателя преломления в разных зонах раствора белка
отражают изменения концентрации белка; другими словами, гра-
диент показателя преломления связан с распределением и количе-
ством растворенного вещества, в данном случае белка.

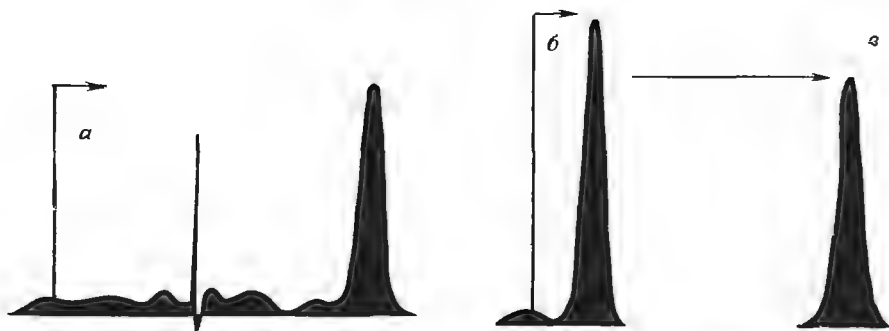


Рис. 5.23. Электрофоретическое разделение сложной смеси белков плазмы крови человека (а), одиночный пик кристаллической карбоксипептидазы (б) и гомогенный пик кристаллического бычьего сывороточного альбумина (в). Вертикаль — стартовая граница белкового раствора. Пик в начальном положении обусловлен присутствием солей буферного раствора.

На рис. 5.23 представлены электрофореграммы двух высокоочищенных белков (б и в). Там же в качестве примера разделения сложных белковых смесей приведены результаты электрофореза образца нормальной плазмы человека (а). Чистое вещество дает только один симметричный пик, имеющий форму вероятностной кривой. Асимметричность этой кривой, а также наличие нескольких пиков свидетельствуют о присутствии смеси нескольких веществ. В этом случае можно количественно оценить долю каждого из компонентов смеси, определяя отношение площади пика данного вещества к сумме площадей всех пиков.

Разделение заряженных соединений с помощью электрофореза можно проводить не только в растворе, но и в различных пористых инертных средах, таких, как крахмал, силикагель, полиакриламидный гель, смоченная фильтровальная бумага. Раствор смеси веществ обычно наносят в виде четкого пятна или зоны, а затем проводят электрофорез, добиваясь иногда полного разделения всех компонентов смеси. Этот процесс, называемый *зонным электрофорезом*, применяют как для аналитических, так и для препаративных целей. Электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия широко используют для определения молекулярных масс полипептидов (разд. 5.1.7); метод иммуноэлектрофореза рассмотрен в гл. 30.

5.6.5 Критерии чистоты

Ранее (разд. 5.6 и след.) уже рассмотрены принципы и приведены примеры использования различных каскадных методов выделения, очистки и количественного анализа компонентов сложных смесей. Эти же методы часто оказываются полезными для уста-

новления степени чистоты веществ. Обычным критерием чистоты низкомолекулярных веществ биологического происхождения является сохранение физических констант и элементного состава после повторных очисток. Хорошие результаты получают при использовании одного или более «каскадных» методов. Чистоту низкомолекулярных ионных соединений можно оценить, например, с помощью зонного электрофореза, ионообменной хроматографии или хроматографии на бумаге, а неионных веществ — с помощью хроматографии на бумаге, адсорбционной или газожидкостной хроматографии.

Обычные критерии, принятые для оценки чистоты низкомолекулярных веществ, малоприменимы к белкам, нуклеиновым кислотам и полисахаридам. Эти макромолекулы плохо кристаллизуются и могут образовывать смешанные кристаллы с другими соединениями; они, как правило, не имеют определенной точки плавления. Определение элементного состава в этом случае не имеет смысла вследствие наличия огромного числа атомов в макромолекулах. Однако что касается белков, то число остатков каждой аминокислоты, рассчитанное на молекулу индивидуального белка, должно быть целочисленным; следовательно, когда в молекулу белка входит небольшое число остатков какой-либо аминокислоты, аминокислотный анализ дает ценную информацию о гомогенности белка.

Непосредственных способов определения чистоты макромолекул не существует; для этих целей используются методы обнаружения примесей, т. е. доказательства негомогенности образца. Считается, что вещество является чистым, если ни один из возможных методов не выявляет его негомогенность. Для обнаружения примесей прежде всего используются каскадные методы.

Гомогенность образца по молекулярной массе может быть установлена с помощью методов ультрацентрифугирования или гель-фильтрации. Но эти методы менее чувствительны по сравнению с каскадными методами, в которых разделение макромолекул зависит от их суммарного заряда. Для установления чистоты белков, пептидов и олигонуклеотидов очень полезны методы зонного электрофореза, особенно при изучении электрофоретического поведения образца в нескольких буферных системах с различными значениями pH. С помощью ионообменной хроматографии также можно обнаружить присутствие примесей. Распределительная хроматография и противоточное распределение были успешно использованы при изучении лишь немногих белков из-за ограниченной растворимости и относительной нестабильности большинства белков в неполярных растворителях. Чистоту пептидов, содержащих до 40—50 остатков аминокислот, можно во многих случаях установить с помощью хроматографии на бумаге. Часто макромолекулярное вещество, кажущееся гомогенным при исследовании одним методом, оказывается негомогенным при использовании другого метода. На-

пример, по результатам ультрацентрифугирования присутствующие в растворе молекулы белка имеют одинаковые размеры и форму, а согласно данным электрофореза, в растворе имеются примеси. При определении чистоты любого вещества следует применять методы, основанные на различных свойствах молекулы, таких, как размер, заряд, растворимость и т. д.

Многие белки обладают специфическими функциональными свойствами: одни являются гормонами, другие — ферментами, третьи — переносчиками кислорода и т. д. Методы обнаружения белков, основанные на их специфических функциональных свойствах, являются чрезвычайно чувствительными, поскольку наличие очень небольших количеств таких белков может быть зафиксировано по физиологическому действию, каталитической активности и т. п.; если препарат белка обладает рядом каталитических или других функций, за которые отвечает единственный белок, то дополнительная очистка или частичная инактивация белка не должна изменять соотношения функциональных активностей. Например, если ферментативный препарат действует на вещество А в 10 раз быстрее, чем на В, а при повторной очистке фермента отношение изменяется от 10:1 до 100:1, то этот факт свидетельствует о том, что за два каталитических эффекта ответственны разные ферменты.

Критерий функциональной гомогенности благодаря высокой чувствительности самого теста является одним из наиболее важных при исследовании белков. Часто оказывается возможным зафиксировать с помощью теста на функциональную активность наличие примесей, присутствующих в крайне низких концентрациях (одна часть примеси на несколько тысяч или миллионов частей основного белка). Такая чувствительность намного превышает чувствительность большинства физических или химико-аналитических методов.

Большинство белков, а также некоторые полисахариды и липиды обладают свойствами антигенов, т. е. они стимулируют образование специфических антител после инъекции подопытному животному. Инъекция индивидуального вещества вызывает образование антител одного типа, тогда как смесь антигенных веществ вызывает образование нескольких типов антител. Этот биологический метод установления гомогенности белковых препаратов может быть таким же чувствительным, как методы, основанные на детекции по энзиматическому или гормональному действию, при условии, что примеси обладают антигенными свойствами.

Количество белка-антигена в растворе можно определить путем добавления специфической антисыворотки (гл. 30) с последующим отделением образующегося осадка и определением его количества любым доступным методом.

См. литературу к гл. 6.

Глава 6

БЕЛКИ. III

Аминокислотная последовательность и конформация белков

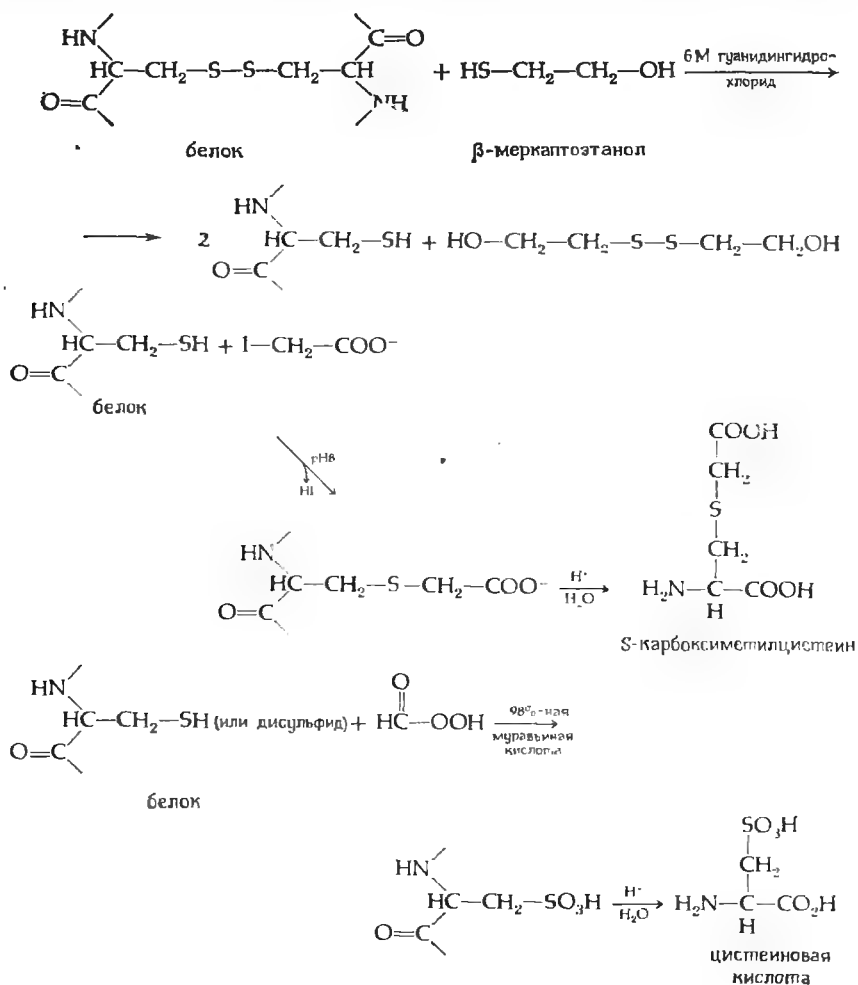
Принято рассматривать четыре уровня структурной организации белков. Термин *первичная структура* относится к аминокислотной последовательности и используется часто наряду с термином *ковалентная структура*. Термин *вторичная структура* характеризует различные типы регулярных структур, встречающихся во многих белках, например спиральные структуры (α -спирали), образованные единичной полипептидной цепью, и складчатые листы (β -структуры), образованные двумя или несколькими участками цепи. Термин *третичная структура* характеризует конформацию белка в целом, его пространственную структуру. Термин *четвертичная структура* относится к пространственному взаиморасположению субъединиц белка, если таковые существуют. Вторичную, третичную и четвертичную структуры в совокупности часто называют *нековалентной структурой*.

6.1. Первичная структура

6.1.1. Аминокислотный состав

Прежде чем определять аминокислотную последовательность белка, необходимо установить его аминокислотный состав. При этом можно использовать различные методы (разд. 4.1.3.3 и след.). Наиболее широко применяемый в настоящее время количественный метод аминокислотного анализа белкового гидролизата основан на использовании ионообменной хроматографии (разд. 5.6.3.3 и след.). Белок обычно гидролизуют в 6 н. HCl при 100 °C в течение 20 и более часов в отсутствие воздуха. Как правило, проводят несколько параллельных опытов с различной продолжительностью гидролиза; при этом удастся оценить скорость разрушения лабильных аминокислот, таких, как серин, треонин и тирозин, а также добиться полноты гидролиза наиболее стабильных пептидных связей, особенно образованных остатками изолейцина и валина. При кислотном гидролизе разрушается триптофан; его можно опреде-

лить спектрофотометрическими методами. Глутамин и аспарагин превращаются в соответствующие дикарбоновые кислоты; однако амиды могут быть определены после исчерпывающего гидролиза протеолитическими ферментами или непосредственно при установлении аминокислотной последовательности. Содержание цистеина и цистина в белках трудно оценивать количественно при исследовании гидролизатов обычными методами, поскольку эти остатки частично разрушаются при кислотном гидролизе, плохо разделяются в ходе ионообменной хроматографии и слабо окрашиваются нингидрином. Суммарное содержание цистеина и цистина можно точно определить двумя методами. Ниже приведены соответствующие схемы реакций:



Если обработать белок избытком надмуравьиной кислоты, то остатки цистеина и цистина окисляются до остатков цистеиновой кислоты. При полном гидролизе цистеиновая кислота освобождается почти количественно и легко определяется с помощью ионообменной хроматографии. В другом методе дисульфидные связи восстанавливают избытком меркаптоэтанола в 6 М гуанидингидрохлориде; при этом образуются остатки цистеина. Последние при реакции с иодацетатом превращаются в остатки S-карбоксиметилцистеина. S-Карбоксиметилцистеин стабилен при кислотном гидролизе в присутствии восстановителей и может быть определен путем ионообменной хроматографии.

По результатам определения содержания цистеиновой кислоты или S-карбоксиметилцистеина нельзя судить о том, присутствуют ли в белке цистеин и цистин или только один из них. Таким образом, по числу остатков цистеиновой кислоты или S-карбоксиметилцистеина судят о содержании полуцистина. Для установления соотношения между цистеином и цистином в белке можно определить содержание тиоловых групп (т. е. содержание цистеина) различными методами, например с помощью реагента Элмана (разд. 4.1.3.3). Если известно суммарное содержание полуцистина и определено количество тиоловых групп (цистеина), можно рассчитать содержание в белке цистина.

Приведенные в табл. 6.1 данные показывают, что аминокислотный состав представленных белков существенно различается. Например, в гормоне инсулине отсутствуют триптофан и метионин, а в глобулине — цистеин и цистин. В табл. 6.1 содержание различных аминокислот выражено в граммах на 100 г исходного белка; при суммировании получим, что на 100 г белка приходится ~118 г аминокислот (с учетом одной молекулы воды на каждую гидролизующую пептидную связь). Если же при расчете содержания аминокислот учитывать *массу аминокислотных остатков*, а не свободных аминокислот, то суммарное содержание аминокислот в белке, не содержащем неаминокислотных компонентов, должно составлять 100%. Приведем пример такого расчета. При гидролизе инсулина образуется 8,6 г свободного фенилаланина на 100 г белка (табл. 6.1). В пересчете на массу аминокислотного остатка это составляет $8,6 \cdot 147/165 = 7,7$ г на 100 г белка, поскольку молекулярная масса фенилаланина 165, а масса остатка фенилаланина в белках 147.

При изучении структуры белка более информативен другой метод выражения данных аминокислотного анализа. Если известна молекулярная масса белка, то можно рассчитать число аминокислотных остатков в молекуле; оно должно быть целым, поскольку в белке не может присутствовать часть остатка. Эти значения также приведены в табл. 6.1.

Таблица 6.1
Содержание аминокислот в белке и число остатков, приходящееся на одну молекулу

Аминокислота или другой определяемый компонент	Инсулин (быка)		Рибонуклеаз (быка)		Цитохром с (лошади)		Гемоглобин (человека)		Миоглобин (человека)	
	Содержа- ние амино- кислот, %	Число остатков	Содержа- ние амино- кислот, %	Число остатков	Содержа- ние амино- кислот, %	Число остатков	Содержа- ние амино- кислот, %	Число остатков	Содержа- ние амино- кислот, %	Число оста- т- ков
Аланин	4,6	3	7,7	12	3,5	6	9,0	72	5,7	12
NH ₂ из амидов	1,7		2,1		1,1		0,9		1,1	
Аргинин	3,1	1	4,9	4	2,7	2	3,3	12	2,7	2
Аспарагин		3		10		5		20		3
Аспарагиновая кис-	6,7	0	15,0	5	7,6	3	9,6	30	9,2	8
лота										
Цистин	0		0		1,7	2	1,0	6	0	
Цистин	12,2	6	7,0	8	0		0		0	
Глутаминовая кисло-	17,9	4	12,4	5	13,0	9	6,6	24	17,3	14
та										
Глутамин		3		7		3		8		7
Глицин	5,2	4	1,6	3	5,6	12	4,2	40	6,3	15
Гистидин	5,4	2	4,2	4	3,4	3	8,8	38	8,2	9
Изолейцин	2,3	1	2,7	3	5,4	6	0		5,0	8
Лейцин	13,5	6	2,0	2	5,6	6	14,0	72	12,2	17
Лизин	2,6	1	10,5	10	19,7	19	9,6	44	16,1	20
Метионин	0		4,0	4	2,1	2	1,2	6	2,5	3
Фенилаланин	8,6	3	3,5	3	4,5	4	7,3	30	6,2	7
Пролин	2,1	1	3,9	4	3,3	4	4,8	28	4,0	5
Серин	5,3	3	11,4	15	0		4,4	32	4,6	7
Треонин	2,0	1	8,9	10	8,4	10	5,2	32	2,9	4
Триптофан	0		0		1,5	1	1,9	6	3,6	2
Тирозин	12,6	4	7,6	6	4,9	4	2,9	12	2,4	2
Валин	9,7	5	7,5	9	2,4	3	10,3	62	5,3	7
Всего ^a		51		124		104		574		153

^a Суммарное содержание, превышающее 100%, объясняется присоединением воды (см. объяснения в тексте).

6.1.2. Субъединичная структура

Прежде чем анализировать последовательность аминокислот в белке, необходимо определить, содержит ли белок одну субъединицу (полипептидную цепь) или состоит из нескольких субъединиц. Если обнаружено несколько субъединиц, следует установить, идентичны ли их аминокислотные последовательности и связаны ли они межцепочечными дисульфидными мостиками. Для получения необходимой информации особенно полезны методы определения молекулярных масс в различных условиях (гл. 5). В настоящее время обычно проводят седиментационно-равновесный анализ на ультрацентрифуге. Важно прежде всего определить молекулярную массу белка в его нативной конформации, затем молекулярную массу белка в 6 М растворе гуанидингидрохлорида, который денатурирует молекулу, разрушая ее третичную и четвертичную структуру. Если в обоих случаях получают одно и то же значение, то белок содержит либо единственную полипептидную цепь, либо две или более цепей, соединенных дисульфидными мостиками. Далее молекулярную массу определяют в присутствии смеси 6 М раствора гуанидингидрохлорида и меркаптоэтанола, при этом в дополнение к разрушению третичной и четвертичной структур восстанавливаются дисульфидные мостики. Если все три метода дают одно и то же значение молекулярной массы, то значит белок содержит одну полипептидную цепь. Если же при определении в гуанидингидрохлориде значение оказывается меньшим, но совпадает с найденным в смеси гуанидингидрохлорида и меркаптоэтанола, то, по-видимому, в белке содержится несколько субъединиц, не связанных дисульфидными мостиками. В этом случае молекулярная масса, определенная в растворе гуанидингидрохлорида, должна быть кратной молекулярной массе нативного белка, т. е. если она равна половине массы нативной молекулы, то белок, вероятно, содержит две субъединицы, если же одной четверти — четыре субъединицы и т. д. (при условии, что все субъединицы одинаковы по размерам). Если же в белке присутствуют субъединицы различных размеров, то проще всего убедиться в этом с помощью электрофореза в геле в присутствии додецилсульфата натрия (разд. 5.1.7). В качестве примера можно привести иммуноглобулины, которые содержат субъединицы совершенно разных размеров. В табл. 6.2 приведен ряд белков с известной субъединичной структурой, в ней же даны некоторые их структурные характеристики.

Данные по определению молекулярной массы сами по себе недостаточны для того, чтобы решить вопрос об идентичности всех субъединиц данного белка. Нативный гемоглобин имеет молекулярную массу 65 000; однако при определении молекулярной массы в денатурирующих условиях (как в присутствии, так и в отсутствие меркаптоэтанола) получают значение, приблизительно в че-

Таблица 6.2
 NH₂-Концевые остатки, число и тип дисульфидных мостиков и количество субъединиц в некоторых белках

Белок	Источник	Молекулярная масса	NH ₂ -концевые остатки	Число связей S—S			Число цепей	Последовательности цепей субъединиц
				внутрицепочечные	межцепочечные			
Инсулин	Поджелудочная железа быка ^a	5 700	1 Phe, 1 Gly	2	1		2	2 различные
Рибонуклеаза T1	<i>Aspergillus</i> ^a	11 100	1 Ala	0	2		1	
Цитохром c	Сердце позвоночных ^a	12 400	1 Ацетил-Gly	0	0		1	
Рибонуклеаза	Поджелудочная железа быка ^a	13 700	1 Lys	0	4		1	
Трипсиноген	То же	24 400	1 Val	0	6		1	
α-Химотрипсин	» »	24 300	1 Ile, 1 Ala, 1 Cys	2	2		3	3 различные
Гемоглобин	Эритроциты человека ^a	65 000	4 Val	0	0		4	2 различные
Альбумин	Сыворотка человека ^a	66 500	1 Asp	0	17		1	
Алкогольдегидрогеназа	Печень лошади ^a	80 000	2 Ацетил-Ser	0	0		2	Одинаковые
Гемэритрин	Червь <i>Sipunculus</i> ^a	103 000	1 Gly	0	0		8	»
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	Мышца кролика ^a	140 000	4 Val	0	0		4	»
Иммуноглобулин γG	Человека	150 000	См. гл. 30	3	8		4	2 различные
Фибриноген	Плазма человека	333 000	2 Ala, 2 Glu, 2 Tyr	Содержит как внутри-, так и межцепочечные дисульфидные мостики			6	3 различные
Фосфорилаза a	Мышца кролика	370 000	4 Met	0	0		4	Одинаковые
Глутаматдегидрогеназа	Печень быка ^a	336 000	6 Ala	0	0		6	»
Синтаза жирных кислот	Крысы	500 000	Неизвестно	Не определено			2	Не определено
Вирус желтой мозаики репы		5 000 000	180 N-Ацетил-Met	0	0		180	Одинаковые

^a Аминокислотная последовательность установлена.

тыре раза меньшее, что свидетельствует о наличии в гемоглобине четырех субъединиц примерно одинаковых размеров, не связанных межцепочечными дисульфидными мостиками. Эти данные, однако, не дают никакой информации о том, идентичны ли аминокислотные последовательности всех четырех цепей гемоглобина, различны ли они или же имеется смешанный вариант.

Вопрос о том, одинаковы или различны аминокислотные последовательности субъединиц, можно выяснить путем определения числа пептидов в ферментативном гидролизате белка. Наиболее широко используемый для этой цели протеолитический фермент — трипсин, гидролизующий только те пептидные связи, которые образованы карбоксильными группами лизина или аргинина. По суммарному содержанию лизина и аргинина в белке можно примерно предсказать число триптических пептидов, которые должны образоваться при полном гидролизе трипсином. Для белка, состоящего из одной полипептидной цепи, число триптических пептидов равно числу остатков лизина и аргинина в молекуле плюс 1. Вдвое меньшее число пептидов образуется из белка, содержащего две субъединицы с одинаковой аминокислотной последовательностью. Пептиды разделяют на бумаге или других подходящих носителях (гл. 5), используя обычно электрофорез в одном направлении и хроматографию в другом с последующим обнаружением пептидов по реакции с нингидрином. Чрезвычайно маловероятно, чтобы два триптических пептида с различной аминокислотной последовательностью обнаружили в виде одного пятна. Более серьезные возможные осложнения обусловлены тем, что значительная часть триптических пептидов оказывается нерастворимой и не проявляется на пептидных картах, как это иногда случается при исследовании крупных белков. Обычно же число обнаруживаемых пептидов довольно близко к ожидаемому. Следовательно, метод пептидных карт в сочетании с определением молекулярной массы достаточно для того, чтобы выяснить, являются ли аминокислотные последовательности субъединиц одинаковыми или различными.

Анализ пептидных карт широко применяется при сравнении белков с весьма близкими структурами, отличающимися одним или несколькими остатками. Многие аномальные гемоглобины (гл. 31) отличаются от нормального одним единственным остатком. Пептид, содержащий такой остаток, обычно проявляет отличную от соответствующего пептида нормального белка электрофоретическую или хроматографическую подвижность (рис. 6.1).

Методы идентификации NH_2 -концевых остатков, обсуждаемые ниже, представляют собой другое мощное средство для выяснения вопроса об идентичности аминокислотных последовательностей полипептидных цепей субъединиц. Неидентичность двух цепей инсулина очевидна (см. табл. 6.2), поскольку на 1 моль инсулина приходится по 1 молю NH_2 -концевых глицина и фенилаланина. В про-

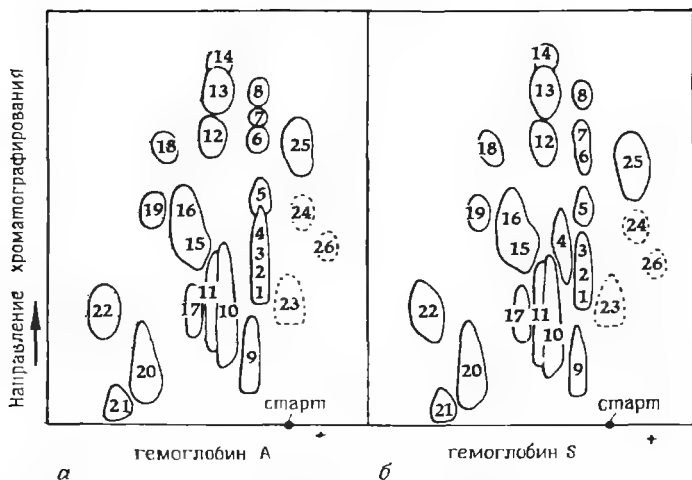


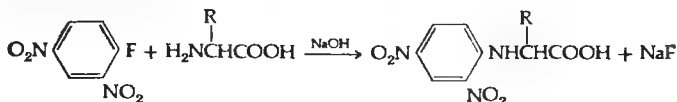
Рис. 6.1. Пептидные карты гемоглобинов человека. Триптические гидролизаты гемоглобина А и гемоглобина S человека были нанесены в стартовые точки на листах фильтровальной бумаги; затем был проведен электрофорез в одном направлении и хроматография — в другом. Пептидные карты гемоглобина А (а) и гемоглобина S (б) были проявлены нингидрином. Нативный гемоглобин содержит 56 остатков лизина и аргинина (табл. 6.1). Поскольку на карте обнаруживается только двадцать шесть пептидов, белок, по-видимому, содержит 2 типа пептидных цепей с различными аминокислотными последовательностями. Если бы все четыре цепи имели идентичные последовательности, было бы обнаружено 15 пептидов, тогда как, если бы все цепи были различными, можно было бы ожидать образования ~60 пептидов. Единственная аминокислота, отличающая гемоглобины А и S, находится в пептиде 4. [Schroeder W. A., The Primary Structure of Proteins, Harper & Row, Publisher, Incorporated, New York, 1968.]

типоволожность этому в *глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе*, содержащей четыре идентичные цепи, определяется 4 моля NH_2 -концевого валина на 1 моль белка. Факт обнаружения одного NH_2 -концевого остатка сам по себе, конечно, не является гарантией идентичности субъединиц; известны примеры, когда в белке имеются цепи с одинаковыми NH_2 -концевыми остатками, но с различными аминокислотными последовательностями, например две различные цепи гемоглобина имеют в качестве NH_2 -концевого остатка валин.

6.1.2.1. Методы идентификации NH_2 -концевых остатков

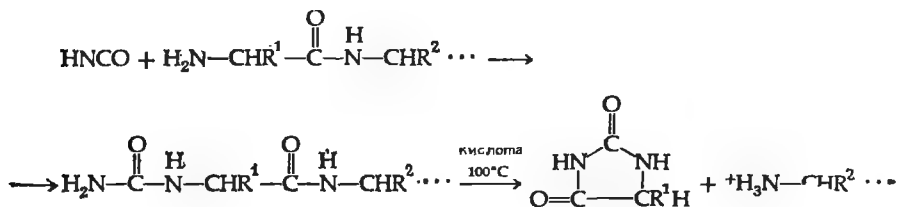
Один из методов основан на использовании реагента, взаимодействующего с аминогруппами белка и не удаляющегося при последующем гидролизе. Установлено, что 2,4-динитрофторбензол (ДНФБ) — подходящий реагент для обнаружения и идентификации NH_2 -концевых остатков. Реагент взаимодействует с α - и ϵ -аминогруппами с образованием окрашенных в желтый цвет динитрофенильных производных (ДНФ-производных), а также с некоторыми другими

боковыми группами аминокислот (имидазольной, феиольной, тиольной), образуя, однако, при этом неокрашенные ДНФ-производные. Ниже приведена реакция ДНФБ с аминокислотой:



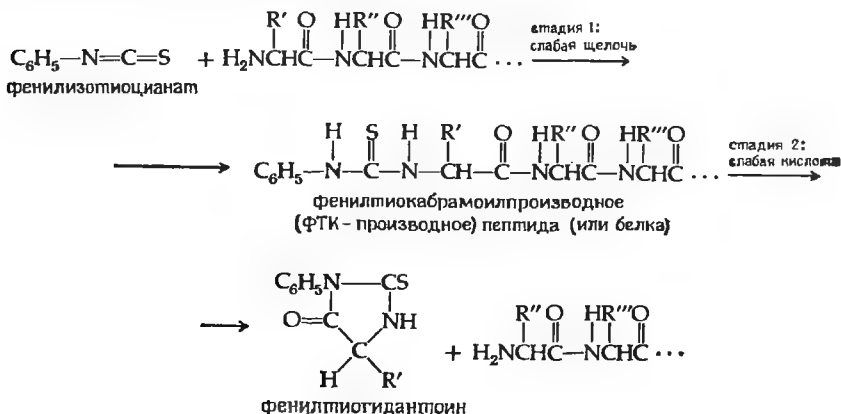
Реакция с белком проводится в слабощелочной среде, затем избыток реагента удаляют и белок гидролизуют в 6 н. HCl. Окрашенные в желтый цвет ДНФ-аминокислоты экстрагируют неполярным растворителем, например хлороформом или эфиром, и разделяют хроматографически. Поскольку после экстракции α -ДНФ-аминокислот ϵ -ДНФ-лизин остается в водной фазе, можно количественно определить содержание ϵ -аминогрупп.

Другой химический метод определения NH_2 -концевых остатков — цианатный метод. При обработке пептидов цианатом в слабощелочном растворе образуется карбамоильное производное.



Нагревание карбамоильного производного в слабой кислоте приводит к отщеплению NH_2 -концевого остатка в виде гидантонина, который может быть легко выделен и после кислотного гидролиза идентифицирован в виде свободной аминокислоты.

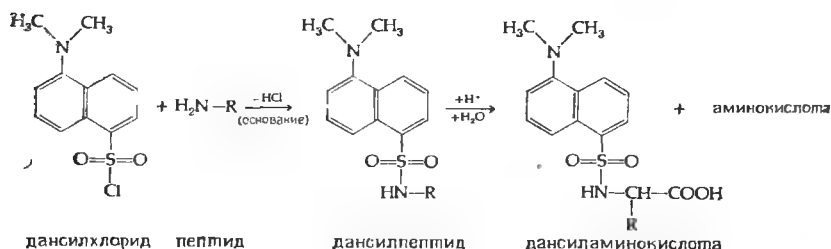
Другой подход основан на использовании реагента, образующего с NH_2 -концевым остатком производное, которое можно затем отщепить, не гидролизуя остальную часть пептидной цепи. С этой целью успешно применяется реагент Эдмана — фенилизотиоцианат (ФИТЦ).



На первой стадии образуется ФТК-производное пептида (или белка), которое затем подвергается действию слабой кислоты (стадия 2) при комнатной температуре. При этом отщепляется *фенилтиогидантоиновое* производное (ФТГ-производное) NH_2 -концевой аминокислоты, а пептид укорачивается на один остаток.

Для проведения последовательной деградации по Эдману часто используют автоматический прибор. При благоприятной ситуации с его помощью может быть пройдено от 40 до 50 «шагов». После каждого шага отщепленный фенилтиогидантоин должен быть идентифицирован с использованием тонкослойной или газожидкостной хроматографии или подвергнут кислотному гидролизу с последующей идентификацией регенерированной аминокислоты.

Чувствительный метод идентификации NH_2 -концевого остатка основан на применении дансилхлорида (1-диметиламинонафталин-5-сульфонилхлорида). Благодаря интенсивной флуоресценции дансильных групп можно обнаружить и определить минимальные количества дансиламинокислот.



Дансильный метод часто используется в сочетании с деградацией по Эдману. После отщепления каждого аминокислотного остатка пробу с пептидом (аликвотную часть) подвергают действию дансилхлорида для выяснения (обычно с помощью тонкослойной хроматографии) природы следующего остатка.

Помимо химических методов определения NH_2 -концевых остатков применяют также ферментативный метод. Используемый при этом фермент *лейцинаминопептидаза* функционировать при наличии у пептида свободной концевой α -аминогруппы. Следовательно, от пептида, имеющего последовательность $\text{NH}_2\text{—A·B·C·D...}$, где A, B, C, D — различные остатки, под действием этой аминопептидазы будут последовательно отщепляться свободные аминокислоты. В любой момент времени количество отщепленной аминокислоты A больше, чем B, а количество B больше, чем C, и т. д. Таким образом, по скорости отщепления аминокислот можно постулировать последовательность ABC. Лейцинаминопептидаза наиболее быстро отщепляет концевой остаток лейцина, однако она действует также и на все другие остатки, имеющиеся в белках, и не расщепляет лишь связь X—Pro (табл. 6.3).

Ступенчатая деградация белка по методу Эдмана или применение аминопептидазы (или карбоксипептидазы, см. ниже) могут дать убедительные результаты только при исследовании единичной пептидной цепи или белка, содержащего несколько одинаковых цепей.

Во многих белках число свободных α -аминогрупп соответствует числу пептидных цепей. Тем не менее известны белки, не имеющие свободной аминогруппы, например цитохром c, овальбумин и белок вируса табачной мозаики. Концевая α -аминогруппа у большинства таких белков ацетилирована. В некоторых белках концевым является остаток пирролидокарбоновой кислоты (пироглутаминовой кислоты). Этот остаток не содержит свободной аминогруппы, он лег-

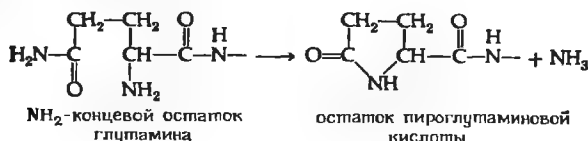
Таблица 6.3
 Специфичность некоторых протеолитических ферментов

Протеолитический фермент	Источник	Основные места действия ^a	Прочие места действия
Трипсин	Поджелудочная железа	Arg, Lys	Не расщепляет X-Pro ^б
Химотрипсин	»	Tyr, Phe, Tyr	Leu, Met, Asp, His
Эластаза	»	Нейтральные алифатические остатки	
Пепсин	Слизистая оболочка желудка	Tyr, Phe, Tyr, Met, Leu	Кислые, а также некоторые другие аминокислотные остатки
Карбоксипептидаза А	Поджелудочная железа	С-Концевая связь остатков Tyr, Trp, Phe и т. д.	Не расщепляет по Arg, Lys, Pro
Карбоксипептидаза В	»	С-Концевые Arg, Lys	Нет
Карбоксипептидаза У	Дрожжи	С-Концевая связь NH ₂ -Концевая связь различных остатков	Все остатки, но Gly слабо
Лейцинаминопептидаза	Почки, слизистая оболочка кишечника и т. д.	Arg, Lys, Gly	Не расщепляет X-Pro ^б
Папаин	Папайя		Широкая специфичность; не расщепляет по кислым остаткам
Субтилзин	<i>Bacillus subtilis</i>	Ароматические и алифатические остатки	Различные аминокислотные остатки
Термолизин	<i>B. thermoproteolyticus</i>	Связи, образованные аминокислотами алифатических остатков	Ala, Phe
Стафилококковая протеаза	Стафилококки	Glu	Некоторые связи Asp

^a Место действия ферментов (за исключением карбоксипептидаз и термолизина) обозначается остатком, которому принадлежит карбоксильная группа расщепляемой пептидной связи. Например, трипсин катализирует гидролиз связей, образованных карбоксильными группами аргинина и лизина.

^б X — любой другой аминокислотный остаток.

ко образуется в определенных условиях из NH_2 -концевого глутамина с элиминированием γ -амидного азота в виде аммиака:



6.1.2.2. Методы идентификации COOH -концевых остатков

Химический метод идентификации остатков, несущих α -карбоксильные группы, основан на реакции белка (или пептида) с гидразином в безводной среде при 100°C . При расщеплении пептидной связи с помощью *гидразинолиза* в гидразиды аминокислот превращаются все аминокислотные остатки, кроме COOH -концевого, который остается в виде свободной аминокислоты и может быть выделен и идентифицирован с помощью хроматографических методов:



Ферментативный метод заключается в использовании панкреатических *карбоксипептидаз*. *Карбоксипептидаза А* отщепляет от белка или пептида только тот остаток, который несет свободную α -карбоксильную группу. По аналогии с методом, в основу которого положено расщепление белка *аминопептидазой* (разд. 6.1.2.1), информацию, касающуюся COOH -концевой последовательности, можно получить с помощью измерения скорости отщепления каждого следующего остатка; например, в белке с последовательностью $\text{NH}_2\text{-A}\cdot\text{B}\cdot\text{C}\cdot\text{D}\dots\text{W}\cdot\text{X}\cdot\text{Y}\cdot\text{Z}\text{-COOH}$ при заданном времени гидролиза количество отщепленного Z всегда больше, чем Y, и т. д. *Карбоксипептидаза А* малоактивна или неактивна вовсе к COOH -концевым остаткам пролина, аргинина или лизина. *Карбоксипептидаза В* в отличие от карбоксипептидазы А отщепляет COOH -концевые остатки лизина и аргинина (табл. 6.3).

6.2. Определение аминокислотной последовательности

6.2.1. Общий подход

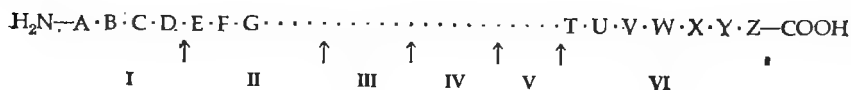
Допустим, что необходимо определить аминокислотную последовательность содержащего одну полипептидную цепь белка, молекулярная масса и аминокислотный состав которого известны и последовательность которого можно представить как



С помощью методов идентификации концевых групп уже определены NH_2 - и COOH -концевые остатки А и Z соответственно. Кроме

того, посредством ступенчатой деградации по Эдману, возможно, определена даже NH_2 -концевая последовательность А·В·С и с помощью карбоксипептидаз идентифицирована последовательность Х·У·Z. Задача теперь состоит в том, чтобы выяснить оставшуюся часть аминокислотной последовательности белка. Общий подход включает следующие стадии: 1) осуществление частичного гидролиза белка ферментами или химическими реагентами; 2) выделение полученных пептидов; 3) определение аминокислотных последовательностей этих сравнительно небольших фрагментов; 4) сборка полной аминокислотной последовательности из перекрывающихся пептидов.

Для определения полной аминокислотной последовательности белка должны быть использованы по крайней мере два различных типа частичного гидролиза с тем, чтобы установить структуру белка методом перекрывающихся пептидов. В качестве иллюстрации ниже приведен некий гипотетический вариант расщепления полипептидной цепи; места расщепления белка одним ферментом, в результате которого образуются пептиды I—VI, показаны стрелками:



Пептидам I и VI можно предварительно приписать их местоположение, если известны NH_2 - и COOH -концевые участки аминокислотной последовательности. Прямого способа определения положения пептидов II, III, IV и V не существует. Однако гидролиз белка другим ферментом приводит к совершенно иным пептидам, поскольку действие этого фермента направлено на другой набор пептидных связей (табл. 6.3). Предположим, получен пептид, имеющий аминокислотную последовательность С·D·E·F·G и т. д., которая перекрывается с последовательностями пептидов I и II, что позволяет установить их порядок. Аналогичным образом можно полностью восстановить всю аминокислотную последовательность белка.

Прежде чем приступить к использованию этих общих приемов, важно провести модификацию остатков цистина и цистеина в белке, поскольку эти остатки очень реакционноспособны по отношению к некоторым применяемым в структурном анализе реагентам; они подвержены взаимному дисульфидному обмену и плохо поддаются количественному анализу. Такая модификация легко осуществляется несколькими методами, включая восстановление меркаптоэтанола и затем реакцию с иодацетатом с образованием S-кар-

боксиметильного производного белка (разд. 6.1.1). Можно применять окисление надмуравьиной кислотой, но только не для белков, содержащих триптофан, который разрушается в этих условиях.

6.2.2. Частичный гидролиз

Существуют два общих метода осуществления частичного гидролиза полипептидов и белков: 1) гидролиз, катализируемый протеолитическими ферментами, и 2) расщепление химическими реагентами.

6.2.2.1. Действие протеолитических ферментов

Протеолитические ферменты катализируют ограниченное расщепление, в результате которого образуются с хорошим выходом относительно крупные фрагменты. Поскольку каждый пептид должен быть выделен в чистом виде, что обычно осуществляется с помощью хроматографических и электрофоретических методов (гл. 5), то чем меньше число фрагментов, тем проще проблема их очистки.

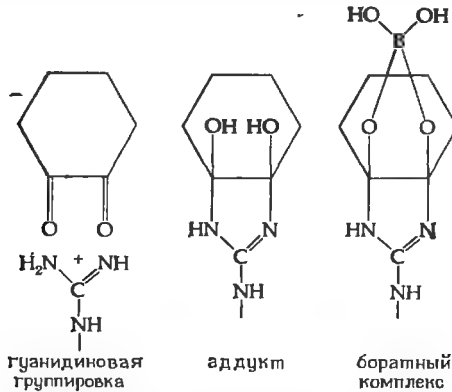
Каждый протеолитический фермент гидролизует пептидные связи только определенного типа. Например, трипсин катализирует гидролиз пептидных связей, образованных исключительно карбоксильными группами лизина или аргинина. Каждый пептид, полученный в результате расщепления трипсином, за исключением, быть может, исходного СООН-концевого, должен оканчиваться остатком аргинина или лизина.

Другие протеазы, как, например, химотрипсин, папаин и т. д., гидролизуют белки или пептиды в других местах пептидной цепи. Специфичность некоторых протеолитических ферментов, доступных в чистом виде и наиболее широко применяемых в структурном изучении белков, приведена в табл. 6.3.

Действие некоторых протеолитических ферментов на окисленную В-цепь бычьего инсулина показано на рис. 6.2. Расщепление ферментами пепсином, химотрипсином или трипсином носит ограниченный характер и относительно специфично по сравнению с фактически беспорядочным частичным кислотным гидролизом.

Трипсин — фермент, чаще всего используемый для получения одного из двух наборов перекрывающихся пептидов, поскольку, во-первых, он почти количественно расщепляет чувствительные к его действию связи; во-вторых, его можно получить свободным от примесей других протеолитических ферментов и, в-третьих, субстратная специфичность трипсина такова, что обычно обеспечивается образование пептидов, удобных по своим размерам для дальнейшего структурного анализа. Второй набор пептидов обычно получают с помощью химотрипсина или пепсина, которые дают, как

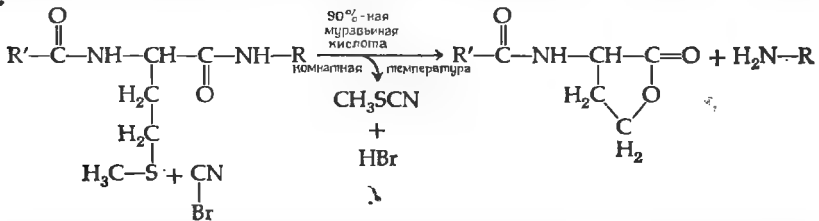
Аналогично этому остатки аргинина взаимодействуют при pH 8—9 с циклогексаноидином (или другим дикарбонильным реагентом), образующим аддукт с гуанидиновой группировкой. Боратный комплекс с вицинальными гидроксидными группами аддукта стабилизирует образованную структуру:



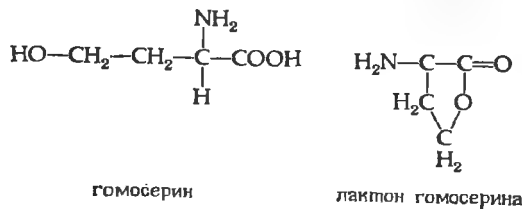
Действие трипсина на обработанные таким образом полипептиды или белки сводится к гидролизу по остаткам лизина. Аргинин может быть регенерирован действием гидросиламина, аммиака или другого нуклеофильного реагента при слабощелочных pH.

6.2.2.2. Специфическое химическое расщепление

Специфический химический метод расщепления по остаткам метионина основан на использовании бромциана (CNBr) в кислой среде, например в 90%-ной муравьиной кислоте:



COOH-Концевой остаток пептида теперь представляет собой лактон гомосерина. При гидролизе 6 н. HCl в описанных выше условиях (разд. 6.1.1) происходит отщепление гомосерина и его лактона:



Поскольку большинство белков содержит относительно небольшое число остатков метионина, метод очень удобен для получения больших пептидов.

6.2.3. Выделение пептидов

Пептиды, образованные при частичном гидролизе, могут быть разделены с помощью целого ряда методов, среди которых наиболее широко применяются гель-фильтрация, ионообменная хроматография и электрофорез на бумаге (гл. 5). Обычно только часть пептидов можно получить в чистом виде с помощью одного из этих методов; смеси пептидов, полученные при разделении одним из методов, должны быть подвергнуты дальнейшему разделению другим методом. Очистка больших гидрофобных пептидов часто вызывает затруднения, но в подобных случаях с успехом применялись такие методы, как гель-фильтрация в водных растворах кислот (например, в 50%-ной уксусной или муравьиной кислоте) или в растворах мочевины или гуанидингидрохлорида (от 2 до 8 моль/л). Благоприятным обстоятельством является доступность различных молекулярных сит, широко применяемых на практике для очистки пептидов (табл. 5.6).

6.2.4. Анализ последовательности аминокислот в пептидах

Аминокислотная последовательность небольших индивидуальных пептидов может быть определена с помощью метода гидролиза ферментами, отщепляющими NH_2 и COOH -концевые остатки, в сочетании со ступенчатым фенолтиогидантоиновым методом*. Для более крупных пептидов может оказаться необходимым дополнительный гидролиз другим протеолитическим ферментом. Так, пептид, полученный при расщеплении трипсином и имеющий структуру $\text{A} \cdot \text{B} \cdot \text{C} \cdot \text{Tyr} \cdot \text{E} \cdot \text{F} \cdot \text{G} \cdot \text{H} \cdot \text{Lys}$ (где A, B, C, E, F, G и H — алифатические остатки типа глицина, аланина, серина и т. д.), может быть гидролизован химотрипсином по остатку тирозина с образованием пептидов $\text{A} \cdot \text{B} \cdot \text{C} \cdot \text{Tyr}$ и $\text{E} \cdot \text{F} \cdot \text{G} \cdot \text{H} \cdot \text{Lys}$. Поскольку положение этих двух пептидов относительно друг друга уже установлено (пептид, содержащий остаток тирозина, — NH_2 -концевой, а пептид, содержащий остаток лизина, — COOH -концевой), дальнейшая работа по установлению последовательности сравнительно проста.

6.2.5. Локализация дисульфидных мостиков

Положение остатков полуцистина, образующих дисульфидные связи в белках, устанавливается в процессе выяснения полной ами-

* В настоящее время наиболее успешно используется высокоэффективная хроматография, в том числе на обращенных фазах [Энгельгардт Х. Жидкостная хроматография при высоких давлениях. М.: Мир, 1980]. — *Прим. ред.*

нокислотной последовательности. Для белков, обладающих дисульфидными связями, но лишенных тиоловых групп, обычно возможно провести гидролиз нативного объекта одним или несколькими протеолитическими ферментами и выделить только цистинсодержащие пептиды. Наиболее подходящие для этой цели ферменты — пепсин и термолизин. Активность пепсина оптимальна между pH 1 и 4, а активность термолизина — между pH 6 и 6,5. При таких концентрациях H^+ дисульфидные связи остаются неповрежденными. Когда получен чистый цистинсодержащий пептид, его восстанавливают меркаптоэтанолом и алкилируют иодуксусной кислотой; два образованных пептида разделяют и определяют состав каж-

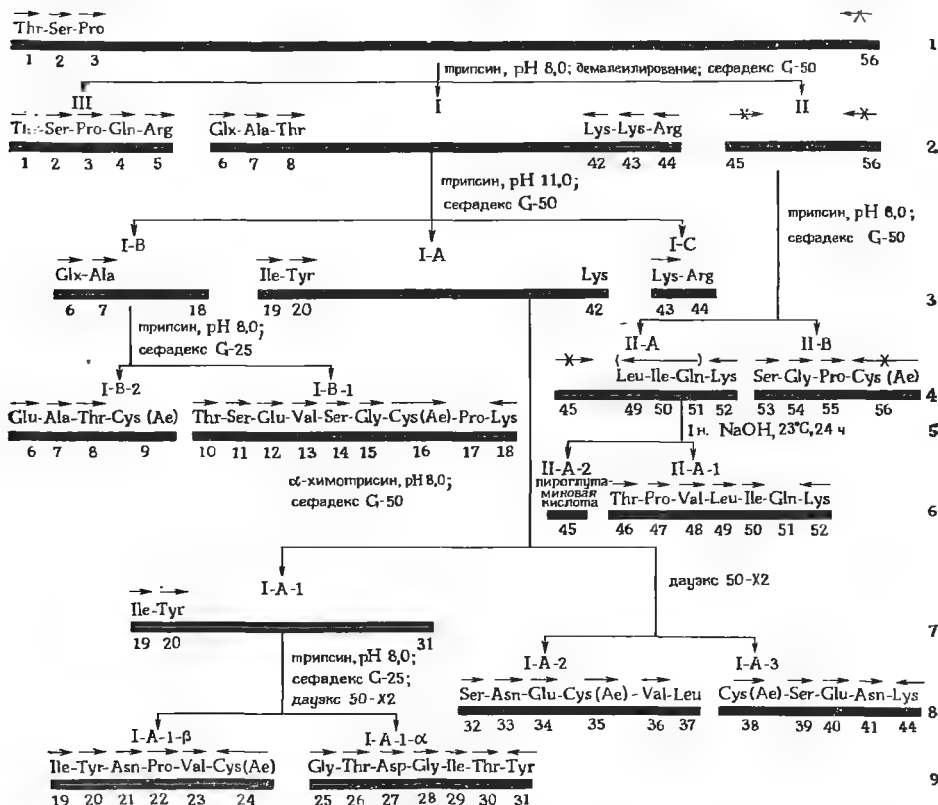


Рис. 6.3. Диаграмма избирательного ферментативного расщепления и определения аминокислотной последовательности маленл-S-2-аминоэтилцистеинилпроизводного ингибитора I свиного панкреатического трипсина. Стрелками над аминокислотными остатками отмечены результаты деградации по Эдману (→) и расщепления карбоксипептидазами A и B (←). Перечеркнутые стрелки (←X—, —X→) указывают на безуспешные попытки исследовать пептид методом, обозначенным соответствующим направлением стрелки. Glx — либо остаток глутамина, либо остаток глутаминовой кислоты. [Bartlett D. C., Greene L. J., J. Biol. Chem., 246, 2218, 1971.]

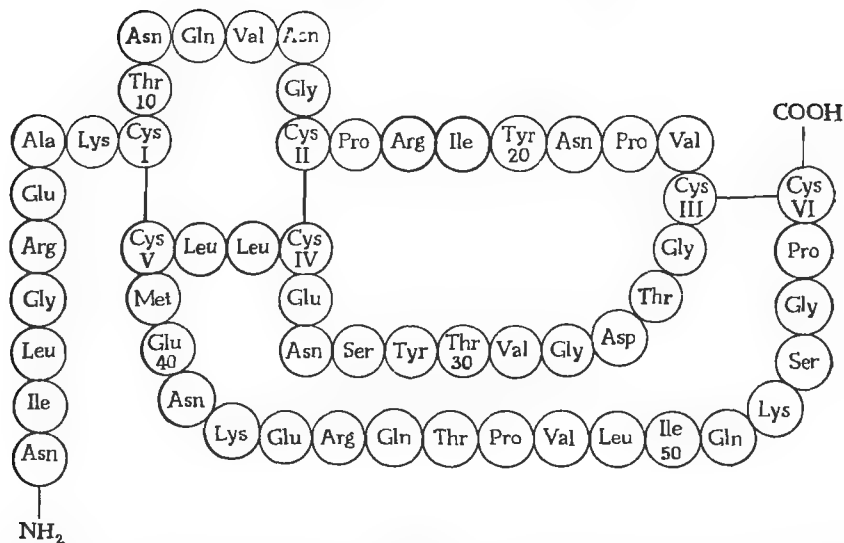


Рис. 6.4. Полная аминокислотная последовательность ингибитора I свиного панкреатического трипсина с указанием положения дисульфидных связей. [Guy O., Shapanka R., Greene Z. J., J. Biol. Chem., 246, 7740, 1971.]

дого из них. Поскольку известна аминокислотная последовательность в районе каждого остатка полуцистина, легко понять, какие именно два остатка образуют дисульфидную связь. Цистинсодержащие пептиды не должны подвергаться действию щелочей или очень сильных кислот, так как дисульфидные связи могут разрушаться и в образующихся продуктах может происходить дисульфидный обмен. В том случае, когда и тиоловые группы, и дисульфидные связи присутствуют в одной и той же молекуле, можно установить, какие именно остатки полуцистина образуют дисульфидные мостики, предварительно проведя реакцию белка в денатурирующих условиях с ^{14}C -иодацетатом, алкилирующим все свободные тиоловые группы и не затрагивающим дисульфидные связи. И дисульфиды, и свободные тиоловые группы могут быть затем локализованы в аминокислотной последовательности, как описано выше.

6.2.6. Аминокислотная последовательность ингибитора I свиного панкреатического трипсина

Описанные выше методы анализа использовались для установления аминокислотных последовательностей многих белков. Чтобы проиллюстрировать применение этих методов на одном белке относительно небольшого размера, на рис. 6.3 приведена общая схема установления последовательности белкового ингибитора панкре-

атического трипсина. Белок прежде всего восстанавливали меркаптоэтанолом и аминоэтилировали. S-Аминоэтилированный белок обрабатывали малеиновым ангидридом с целью защиты аминок групп лизина и S-аминоэтилцистеина, а затем расщепляли трипсином. Полученные пептиды разделяли с помощью гель-фильтрации. Ход дальнейшего анализа последовательности, включая методы частичного гидролиза и разделения пептидов, также показан на рисунке. Окончательный вариант аминокислотной последовательности с правильным расположением дисульфидных мостиков представлен на рис. 6.4.

6.3. Конформация белков

В настоящее время изучена конформация многих белков. Первая работа, в которой сообщалось об установлении полной трехмерной структуры белка (а именно миоглобина кашалота), опубликована в 1961 г. Конформация миоглобина была выяснена с помощью рентгеноструктурного анализа его кристаллов. Этот метод и в настоящее время представляет собой уникальное средство, позволяющее получать данные о пространственном расположении атомов в молекуле белка. Однако точность кристаллографического метода структурного анализа белка пока не достаточна для того, чтобы устанавливать конформацию белка без знания его аминокислотной последовательности. Последнее весьма существенно при интерпретировании кристаллографических данных.

В этом разделе рассмотрен метод рентгеноструктурного анализа, а также представлены основные типы вторичных и третичных структур, обнаруженных в глобулярных белках. Здесь же обсуждаются методы исследования некоторых общих конформационных свойств белков.

6.3.1. Рентгеноструктурный анализ белков

Рентгеновские лучи имеют длины волн, соизмеримые с межатомными расстояниями. При изучении структуры белков часто используется рентгеновское излучение с длиной волны 0,1542 нм, возникающее при облучении электронами атомов меди. При попадании рентгеновских лучей на атом происходит их рассеяние (отражение), пропорциональное числу электронов, окружающих атом. Таким образом, дифракция рентгеновских лучей тяжелыми атомами, обладающими более высокими атомными номерами, гораздо интенсивнее, чем легкими атомами. Любой кристалл можно рассматривать как трехмерный образец, в котором электронная плотность наиболее высока вблизи центров атомов и характеризуется низкими значениями или близка к нулю между атомами.

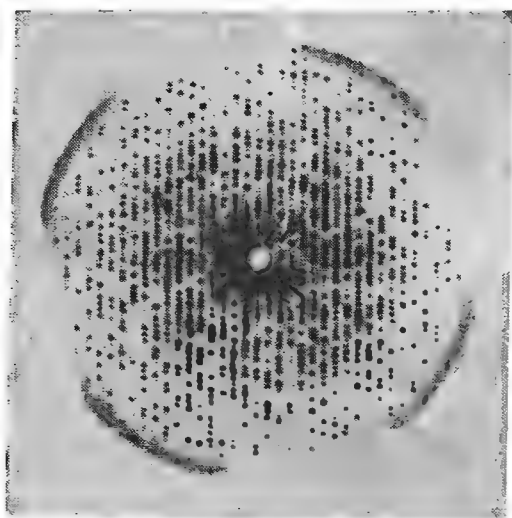


Рис. 6.5. Рентгенограмма кристаллического миоглобина кашалота. Рефлексы образуют регулярную симметричную двумерную решетку. Приведена только часть рентгенограммы. (С любезного разрешения д-ра Джона Кэндрию.)

На рис. 6.5 представлена типичная рентгенограмма кристаллического белка. Дифракционная картина представляет собой набор пятен, образующих регулярную двумерную решетку. Легко заметить, что существует определенная симметрия в характере расположения пятен на рентгенограмме. Рентгенограмму получают следующим образом: небольшой кристалл белка в определенной ориентации помещают на пути тонкого пучка монохроматических рентгеновских лучей. При прохождении через кристалл лучи рассеиваются и попадают затем на фотопластинку, помещенную за кристаллом. Приведенная на рис. 6.5 картина представляет собой двумерную решетку, поскольку фотография была сделана в одной плоскости, в то время как сам кристалл является трехмерным. Сопоставляя дифракционные картины на фотографиях, сделанных в различных плоскостях, можно составить представление о пространственной структуре молекулы. Имея серию рентгенограмм, подобных приведенной на рис. 6.5, можно измерить интенсивность рефлексов и расстояния между ними, что позволяет при соответствующей математической обработке этих данных построить карты электронной плотности. Такие карты в известном приближении характеризуют общую конформацию молекулы и позволяют при более точном анализе выяснить расположение в пространстве каждого тяжелого атома в молекуле белка (при условии, что известна его аминокислотная последовательность).

6.4. Вторичная структура

6.4.1. Геометрия пептидной связи

Детальному изучению пространственной структуры белков предшествовал рентгеноструктурный анализ аминокислот и простых пептидов с целью точного определения длин связей и углов между ними в этих соединениях. Обнаружено, что длина связи $C-N$ в пептиде гораздо меньше, чем во многих других соединениях. Это обстоятельство указывает на особый характер пептидной связи, которая частично обладает свойствами двойной связи, и вращение вокруг нее заторможено по сравнению с другими типами связей ($N-C_\alpha$ и $C-C_\alpha$), образующих остов полипептидной молекулы. Пептидная связь является планарной и жесткой; она обладает *цис*- или *транс*-конфигурацией относительно α -углеродных атомов, расположенных по обе стороны от этой связи. Однако *транс*-конфигурация более предпочтительна, поскольку она менее стерически затруднена R-группами, чем *цис*-форма. На рис. 6.6 представлена пептидная группа в *транс*-конфигурации с указанием длин связей и углов между ними. Исходя из структурных свойств пептидных связей, остов полипептидной цепи можно представить как ряд плоскостей, соединенных между собой связями $N-C_\alpha$ и $C-C_\alpha$ (рис. 6.7). Вращение вокруг связей $N-C_\alpha$ и $C-C_\alpha$ также не является полностью свободным вследствие взаимодействий несвязанных атомов. Кроме того, вращение вокруг связи $N-C_\alpha$ лимитирует степень допустимого вращения вокруг связи $C-C_\alpha$ и наоборот. Угол поворота вокруг связи $C-C_\alpha$ называется *углом* ψ , а угол поворота

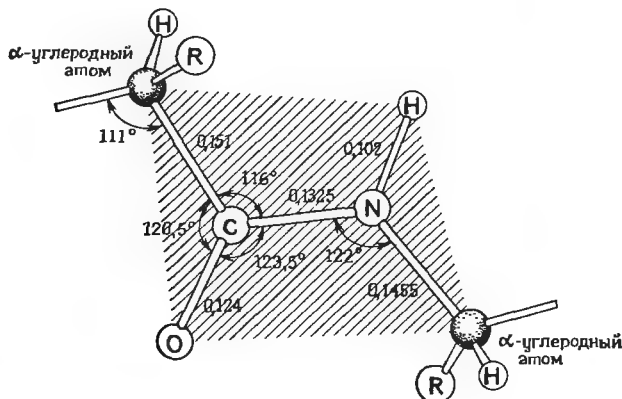


Рис. 6. 6. Длины связей (в нанометрах) и углы между ними в районе пептидной связи и прилегающих C_α -атомов. Атомы, находящиеся в затемненной области, лежат в одной плоскости. [Dickerson R. E., Geis I., The Structure and Action of Proteins, Harper & Row, Publishers, Incorporated, New York, 1969.]

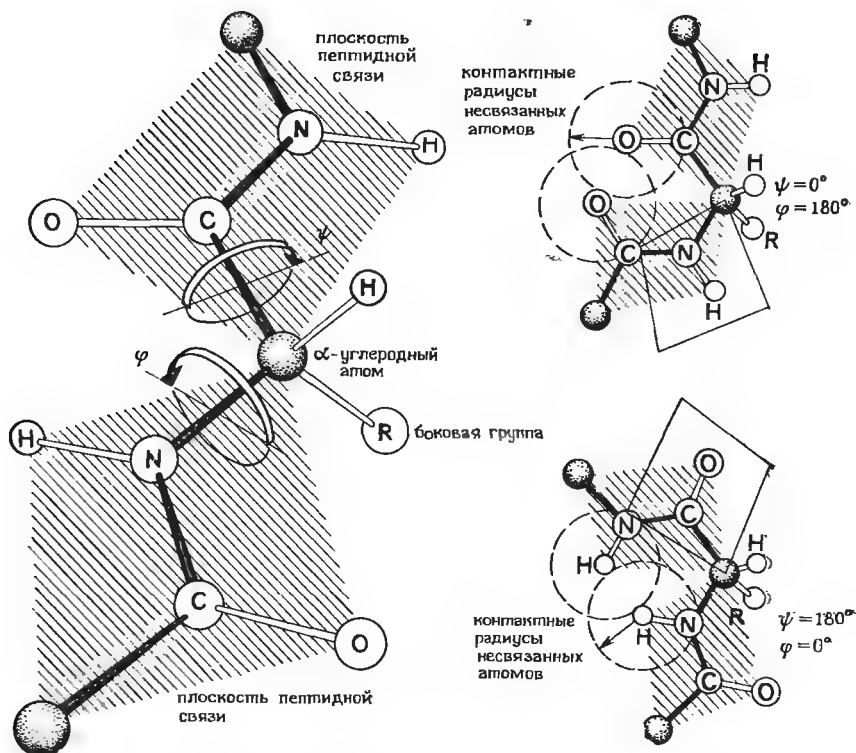


Рис. 6.7. Геометрия двух соседних пептидных связей и допустимое вращение двух образованных ими плоскостей. Углы ψ и ϕ равны нулю, если плоскости пептидных связей (заштрихованные четырехугольники) копланарны. Справа — нереализуемые гипотетические структуры, соответствующие конформациям с максимальным перекрытием контактных радиусов несвязанных атомов при $\psi=0^\circ$, $\phi=180^\circ$ и $\psi=180^\circ$, $\phi=0^\circ$. [Dickerson R. E., Geis I., The Structure and Action of Proteins, Harper & Row, Incorporated, New York, 1969.]

вокруг связи $N-C_\alpha$ — углом ϕ (рис. 6.7). Реальные значения углов ϕ и ψ в белках не являются произвольными, а та или иная вторичная структура способствует определенным типам скручивания белковых молекул. Во всех белках, для которых были определены углы ϕ и ψ , значения этих углов заключены в предполагаемых пределах.

6.4.2. α -Спираль

Одной из наиболее часто встречающихся вторичных структур и одновременно одной из наиболее выгодных из них с учетом ограничений, налагаемых геометрией пептидной связи и допустимыми

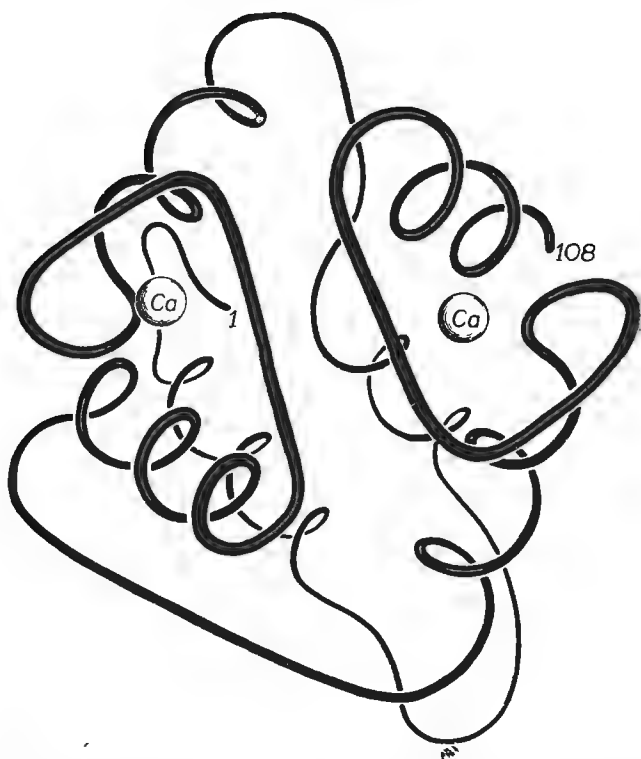


Рис. 6.8. Схематическое изображение скручивания полипептидной цепи кальций-связывающего белка из мышц карпа. NH_2 - и COOH -концевые остатки обозначены номерами 1 и 108. R-группы не показаны на рисунке, в том числе те из них, которые связаны с двумя атомами кальция. В молекуле присутствует шесть спиральных сегментов. (С любезного разрешения Д. Ричардсон.)

изменениями углов ϕ и ψ , является *правая α -спираль*. Первоначально было высказано предположение, что такая спираль существует в белках; однако ее присутствие в глобулярных белках установлено только после определения структуры миоглобина. На рис. 6.8 схематически изображено скручивание полипептидной цепи кальцийсвязывающего белка из мышц карпа, в том числе показано шесть α -спиральных участков молекулы. Одна из спиралей образована остатками от 40-го до 51-го (рис. 6.9). При скручивании полипептидной цепи в α -спираль на один ее виток приходится 3,6 остатка, а шаг спирали составляет $\sim 0,54$ нм. Эта структура в значительной степени стабилизирована водородными связями, образованными между $-\text{CO}-$ и $-\text{NH}-$ группами пептидных связей в спирали. Хотя с помощью рентгеноструктурного анализа нельзя локализовать атомы водорода в белке, еще одним доводом в пользу

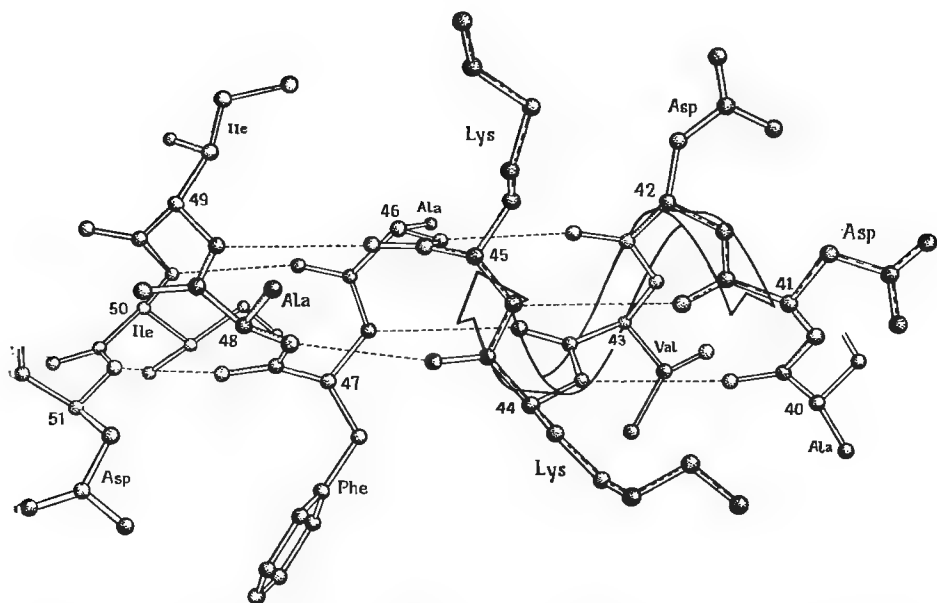


Рис. 6.9. Модель одного из спиральных сегментов (остатки 40—51) в кальцийсвязывающем белке из мышц карпа. Лентой со стрелкой обозначена часть остова полипептидной цепи, соответствующая одному витку α -спирали. Длины связей и углы между ними показаны с помощью стержней, соединяющих атомы C, N и O, изображенных в виде шариков. Водородные связи, образованные между H-атомами, связанными с электроотрицательными атомами азота, и O-атомами, отмечены штриховыми линиями. Атомы водорода не показаны на рисунке. Ближайшая к читателю сторона спирали гидрофильна и участвует во взаимодействии с растворителем; противоположная сторона спирали гидрофобна и содержит боковые цепи, образующие гидрофобную область (см. рис. 6.15). (С любезного разрешения Д. Ричардсон.)

существования водородных связей в α -спирали служит высокая корреляция между предполагаемой длиной водородной связи и расстоянием между соседними $-\text{CO}-$ и $-\text{NH}-$ группами, определенными этим методом. Накоплен также ряд доказательств (помимо кристаллографических) присутствия водородных связей в белках.

В некоторых белках, например в миоглобине и гемоглобине, обнаружены длинные α -спиральные участки. Однако иногда спирали составляют лишь небольшую часть полипептидной цепи или вообще отсутствуют в ней. Некоторые аминокислоты, например пролин, глицин, тирозин и аспарагин, способствуют дестабилизации α -спирали. Другие же аминокислоты, такие, как аланин, лейцин, гистидин, метионин, глутамин, триптофан, валин, глутаминовая кислота и фенилаланин, благоприятствуют образованию α -спирали, особенно если они следуют одна за другой в полипептидной цепи.

6.4.3. Складчатые листки

Другой тип вторичной структуры — β -структура или *складчатый листок*. В белках обнаружено два вида складчатых листков;

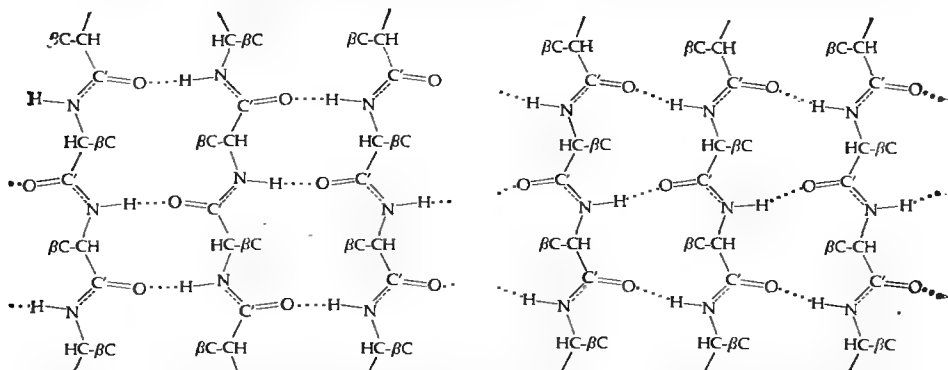


Рис. 6.10. Схематическое представление β -структур. Слева — антипараллельный складчатый листок, справа — параллельный складчатый листок. [Pauling L., Corey R. B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 37, 729—740, 1951.]

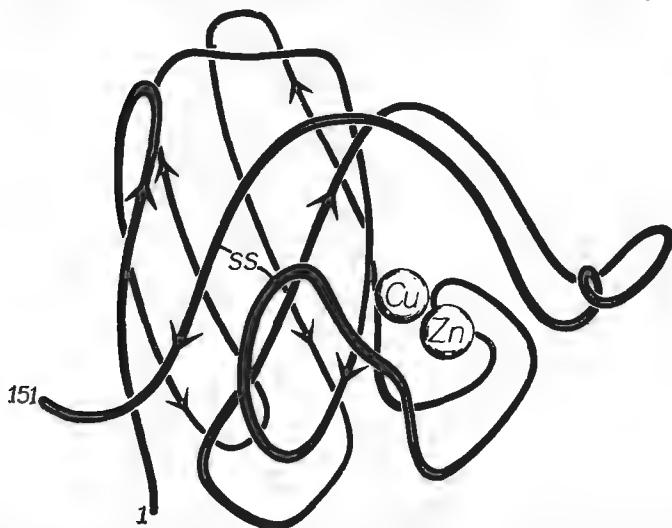


Рис. 6.11. Схематическое изображение скручивания полипептидной цепи супероксиддисмутазы из эритроцитов быка. Белок содержит 151 аминокислотный остаток, одну дисульфидную связь (внутрицепочечную) и по одному атому меди и цинка. Стрелками показано направление полипептидной цепи от NH_2 - до COOH -концевого остатка в тех областях, которые участвуют в образовании складчатых листков. Нативный фермент состоит из двух идентичных цепей или субъединиц, каждая из которых обладает показанной на рисунке конформацией. В глобулярных белках складчатые листки не плоские; антипараллельные складчатые листки часто располагаются в форме цилиндра, как, например, в данном случае. (С любезного разрешения Д. Ричардсон.)

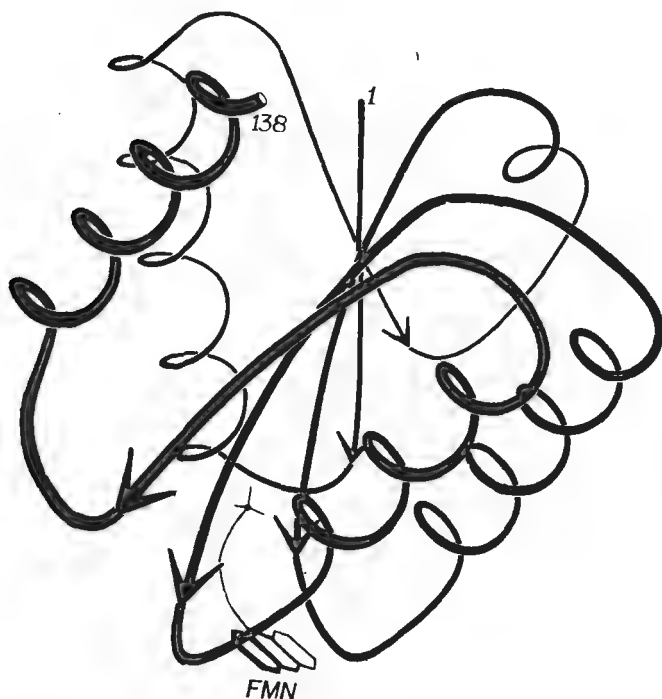


Рис. 6.12. Схематическое изображение скручивания полипептидной цепи флаводоксина (*Clostridium MP*). Белок содержит 138 аминокислотных остатков и одну молекулу нековалентно связанного флавинмонокнуклеотида (FMN) (гл. 13). Стрелками показано направление полипептидной цепи (от NH_2 - до COOH -концевого остатка) в тех ее районах, которые участвуют в образовании параллельных складчатых листов. Параллельные складчатые листки, как правило, не образуют цилиндров. (С любезного разрешения Д. Ричардсон.)

и тот и другой удовлетворяют требованиям структурной геометрии пептидной связи и характеризуются допустимыми для полипептидной цепи значениями углов φ и ψ . Оба вида β -структур схематически изображены на рис. 6.10. Один из них, названный *антипараллельным складчатым листком*, образован вытянутыми полипептидными цепями, аминокислотные последовательности которых, начиная от NH_2 -концевого и кончая COOH -концевым остатком, направлены в противоположные стороны. Второй вид β -структуры — *параллельный складчатый листок* — образован полипептидными цепями, направления которых совпадают. Обе эти структуры стабилизированы широкой сетью водородных связей, в образовании которых участвуют атомы пептидных связей прилегающих друг к другу цепей. На рисунках 6.11 и 6.12 схематически показано скручивание полипептидных цепей супероксиддисмутазы *E. coli* и фла-

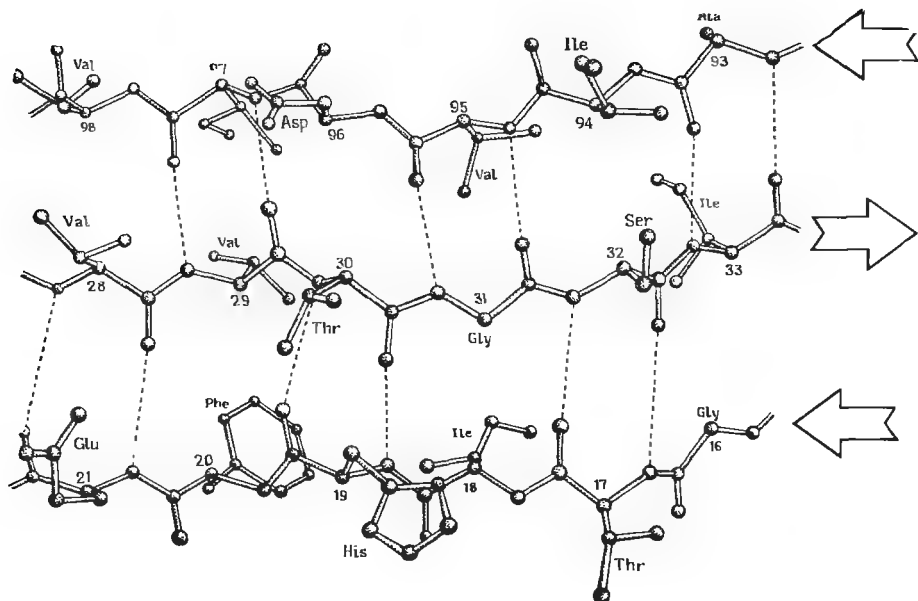


Рис. 6.13. Молекулярная модель антипараллельного складчатого листа в молекуле супероксиддисмутазы (см. рис. 6.11). Длины связей и углы между ними показаны с помощью стержней, соединяющих атомы C, N и O. Стрелками показано направление полипептидной цепи (от NH_2 - до COOH -концевого остатка) в трех ее сегментах, образующих антипараллельный складчатый листок. Штриховыми линиями, соединяющих определенные атомы, обозначены водородные связи, способствующие стабилизации структуры. Атомы водорода не показаны на рисунке. Ближайшая к читателю сторона складчатого листа является гидрофильной и находится на поверхности молекулы, в то время как противоположная сторона гидрофобна и расположена внутри ее. (С любезного разрешения Д. Ричардсон.)

водоксина (гл. 13) соответственно, для которых характерно высокое содержание β -структур. На рис. 6.13 представлена молекулярная модель участка антипараллельного складчатого листа, образованного тремя отдельными сегментами полипептидной цепи супероксиддисмутазы, а на рис. 6.14 — молекулярная модель параллельного складчатого листа во флаводоксине. Антипараллельный складчатый листок может быть образован одной цепью, когда происходит ее изгиб и цепь скручивается «сама с собой», а также двумя или более сегментами цепи, принадлежащими различным участкам молекулы. Оба типа β -структур могут присутствовать в одном складчатом листке, как это имеет место в случае карбоксипептидазы (гл. 9). Некоторые белки, например гемоглобин и кальцийсвязывающий белок, не содержат β -структур. В то же время β -структура — основной тип вторичной структуры ряда фибриллярных белков, в том числе фиброина шелка и

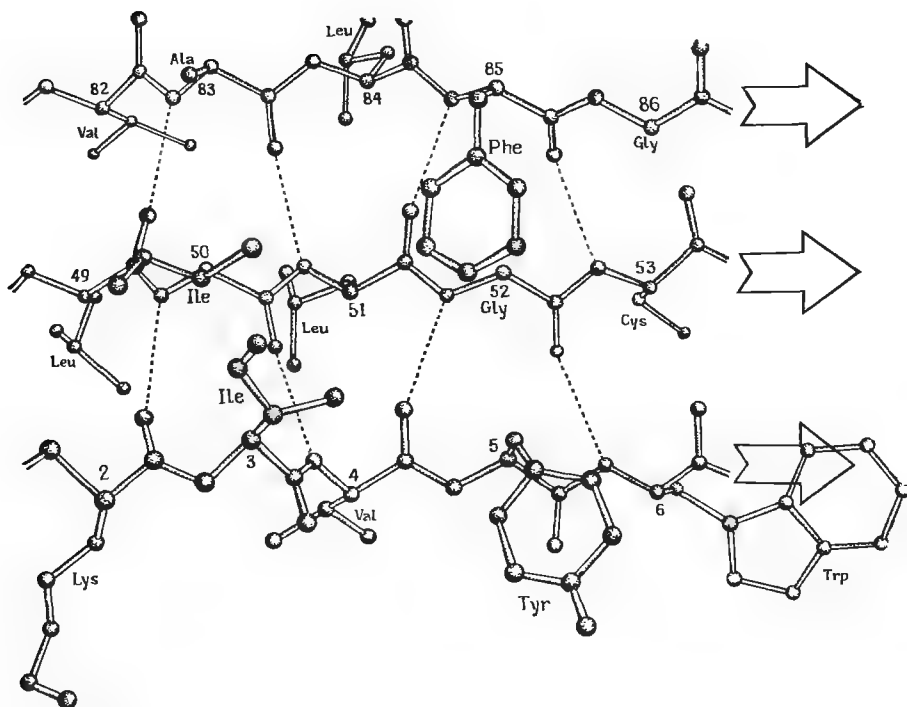


Рис. 6.14. Молекулярная модель параллельного складчатого листа в молекуле флаводоксина (гл. 13). Стрелками показано направление полипептидной цепи (от NH_2 - до COOH -концевого остатка) в трех сегментах, образующих складчатый листок. Все обозначения аналогичны использовавшимся ранее (см. рис. 6.13). Параллельные складчатые листки, как правило, находятся внутри глобулы белка и образуются остатками с гидрофобными боковыми цепями. (Значения координат атомов любезно предоставлены М. Людвиг, рисунок — Д. Ричардсон.)

кератина волос. Некоторые аминокислоты дестабилизируют структуры складчатого листа. Среди них, например, глутаминовая кислота, пролин, аспарагин, гистидин, серин и лизин. Другие аминокислоты, в том числе метионин, валин и изолейцин, способствуют образованию β -структур при определенном их расположении в молекуле. Для предсказания возможности образования складчатых листков, так же как и α -спиралей, были предложены правила, учитывающие тенденцию тех или иных аминокислотных остатков либо стабилизировать, либо нарушать эти вторичные структуры.

6.5. Третичная структура

Нековалентные взаимодействия между спиральными и β -структурными участками полипептидной цепи в совокупности с взаимо-

действиями R-групп и функциональных групп остова молекулы определяют третичную структуру, характерную для данного белка. Существенный момент при формировании третичной структуры — наличие в молекуле белка гидрофобных участков, образованных неполярными R-группами. Одна такая область гидрофобных взаимодействий некоторых R-групп в молекуле кальцийсвязывающего белка (рис. 6.8) показана на рис. 6.15. В образовании таких гидрофобных районов часто принимают участие R-группы аминокислотных остатков, достаточно удаленных друг от друга в полипептидной цепи.

Силы, способствующие формированию конформации белка, отчасти гидрофобны и подобны силам, вызывающим образование

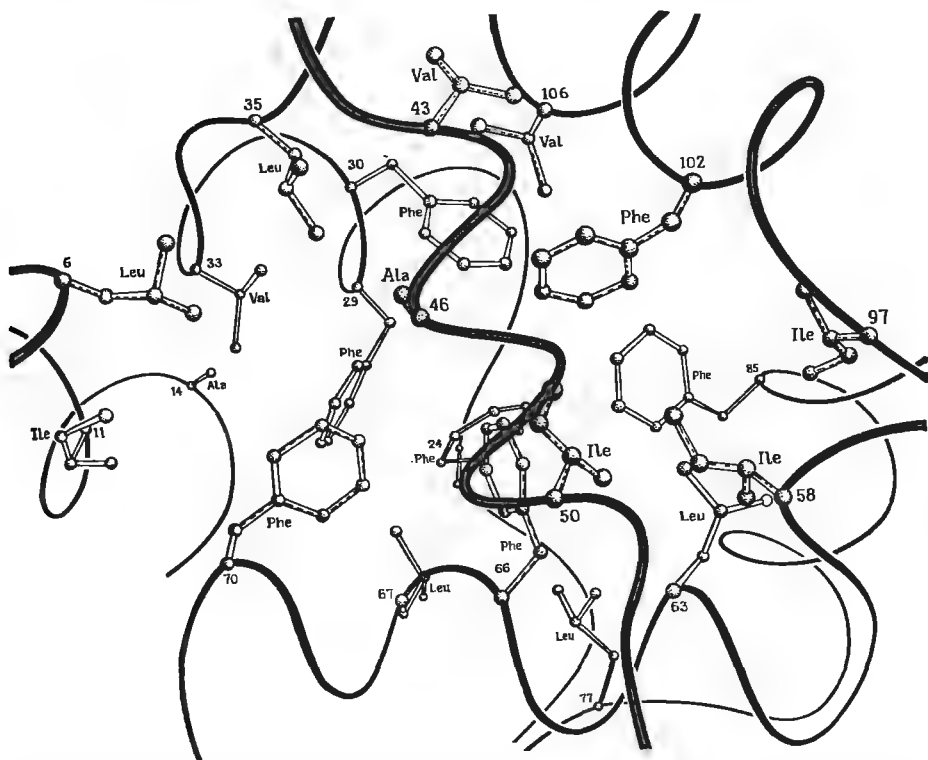


Рис. 6.15. Аминокислотная последовательность участка полипептидной цепи кальцийсвязывающего белка из мышц карпа (см. рис. 6.8) и модель его скручивания с образованием гидрофобной области. Полипептидный остов показан схематически, более подробно изображены R-группы, участвующие в гидрофобных взаимодействиях. R-группы в гидрофобных районах глобулярных белков находятся в тесном контакте и обладают строгой ориентацией относительно друг друга. (Рисунок любезно предоставлен Д. Ричардсон.)

мицелл или бислоев амфифилами (гл. 3); 25—30% аминокислотных остатков в глобулярных белках имеют достаточно гидрофобные R-группы; 45—50% содержат ионные или полярные R-группы. Остальные аминокислоты, например глицин или аланин, могут быть локализованы как внутри, так и на поверхности глобулы. Если белок находится в нативном состоянии, то его гидрофобные R-группы имеют значительно менее выраженную тенденцию к нарушению структуры воды, чем в полностью развернутой полипептидной цепи. Таким образом, нативная структура белка термодинамически более выгодна. Однако нативная третичная структура находится в динамическом равновесии с другими возможными конформациями, что зависит от pH, состава и температуры водной среды. Поскольку гидрофобные R-группы перемежаются с ионными или полярными боковыми группами других аминокислот в полипептидной цепи белка, то для реализации гидрофобных взаимодействий необходимо внедрить некоторые из полярных групп внутрь белковой глобулы. Гидрофобные взаимодействия, образование водородных связей, а также особенности вторичной структуры молекулы сводят к нулю сродство к воде пептидных связей внутри глобулы белка.

Не менее существенное влияние на процесс формирования нативной конформации белка оказывают ионогенные R-группы, особенно R-группы аспарагиновой и глутаминовой кислот, аргинина и лизина, для «погружения» которых внутрь белковой молекулы необходимы значительные затраты энергии. Эти ионогенные группы в водной среде стремятся оставаться преимущественно на поверхности молекулы, подобно тому как это имеет место в процессе мицеллообразования. Поскольку ионогенные и неполярные боковые группы не отделены друг от друга в полипептидных цепях глобулярных водорастворимых белков, можно предположить, что при нормальных пропорциях аминокислотных остатков в белке число возможных последовательностей, способных образовать стабильные конформации, ограничено. Кроме того, произвольная аминокислотная последовательность не обязательно образует глобулярную структуру. Нативные конформации белков могут быть отобраны в процессе эволюции, в результате чего сохраняются те последовательности, которые обеспечивают формирование конформаций, стабилизированных водородными связями и содержащих внутри глобулы гидрофобные домены, а на поверхности гидрофильные ионогенные группы. Таким образом, образование специфической нативной глобулярной структуры, характерной для данного белка, — кооперативный процесс, основанный на различных типах нековалентных взаимодействий. Дисульфидные связи не определяют характер свертывания полипептидной цепи, но, несомненно, стабилизируют конформацию молекулы после завершения процесса свертывания; такие связи образуются самопроизвольно, когда

вследствие взаимодействий R-групп, определяющих правильное скручивание полипептидной цепи, соответствующие тиольные группы оказываются рядом. Это было показано на нескольких белках, в том числе на ферментах рибонуклеазе и лизоциме, каждый из которых содержит четыре дисульфидные связи. Полностью восстановленные формы обоих белков, растворенные в 8 М мочеvine, совершенно лишены ферментативной активности и обладают произвольными конформациями. В каждом из этих белков существует $4^4 = 256$ теоретических возможностей образования дисульфидных связей, однако только четыре из них реализуются, когда из раствора с помощью диализа удаляется мочеvина и молекулы белка принимают свою нативную конформацию в присутствии кислорода. При этом восстанавливается первоначальная ферментативная активность.

Хотя большая часть гидрофобных остатков расположена внутри глобулы белка, а внешняя ее поверхность преимущественно гидрофильна (по причинам, обсуждавшимся ранее), следует иметь в виду, что ситуация не настолько проста. Связывание белка с другими молекулами, например связывание фермента с его субстратом или коферментом, почти всегда осуществляется с помощью небольшого гидрофобного участка на поверхности белка. Этот район обычно не гидратирован (или мало гидратирован) с тем, чтобы обеспечить возможность гидрофобных взаимодействий. Большинство липидов (гл. 17—19) образуется или разрушается при взаимодействии с ферментами. Это взаимодействие должно носить гидрофобный характер, что справедливо также для всех субстратов, содержащих неполярные R-группы. Аналогично многие ферменты (или другие белки), присутствующие в мембранах, прочно ассоциированы с различными липидами (гл. 11). Взаимодействия такого рода также свидетельствуют о «мозаичном» строении поверхности белка, которая в основном гидрофильна, но содержит небольшие неполярные участки.

6.6. Четвертичная структура

Аминокислотные последовательности субъединиц белка, если таковые имеются, определяют ее четвертичную структуру. Это следует из данных рентгеноструктурного анализа, а также из факта реконструкции функционально активного нативного белка из диссоциированных субъединиц. В качестве примера белка, обладающего четвертичной структурой, может служить гемоглобин. В ацетоне при кислом pH гем легко отделяется от денатурированного глобина. Однако при нейтральных pH имеет место рекомбинация гема и глобина с образованием нативного гемоглобина. Таким образом, возможно восстановление нативной конформации даже та-

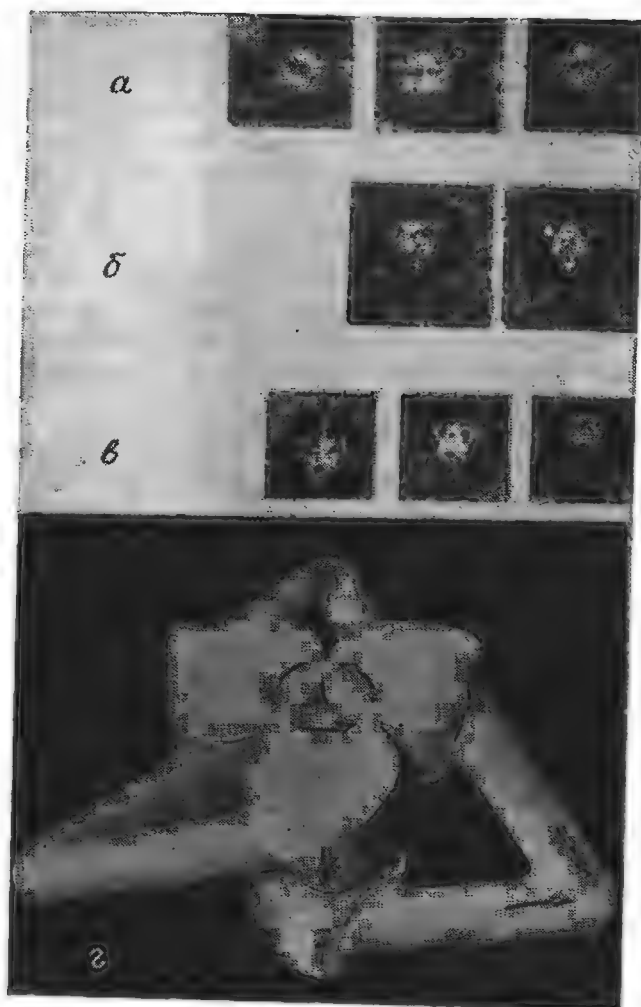


Рис. 6.16. Электронная микрофотография аспартат-транскарбамоилазы (вверху) и предложенная на этой основе модель четвертичной структуры белка (внизу). Показаны отражения негативно контрастированных частиц вдоль одной оси (а), а также усредненные отражения (б), являющиеся результатом наложения пяти отражений типа (а). Отражения (в) получены в плоскости, перпендикулярной плоскости рисунков (а). Модель изображает предполагаемую ориентацию полипептидной цепи аспартат-транскарбамоилазы, основанную на данных электронной микроскопии. Субъединицы С объединены в тримеры, один из которых находится на вершине другого. Шесть субъединиц R расположены на периферии молекулы и взаимодействуют друг с другом, а также с субъединицами С. [Richards K. E., Williams R. C., Biochemistry, 11, 3393, 1972 (микрофотографии); Cohlberg J. A., Pigiet V. P., Jr., Schachman H. K., Biochemistry, 11, 3396, 1972 (модель).]

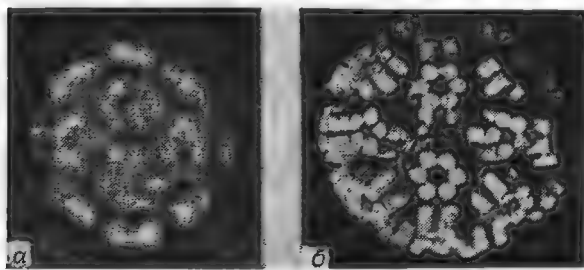


Рис. 6.17. Электронная микрофотография вируса желтой мозаики репы (а) и модель вируса, построенная на основе данных электронной микроскопии (б). [Finch J. T., p. 479, in: Neurath H., Hill R. L., eds. *The Proteins*, vol. I, Academic Press, Inc., New York, 1975.]

кой сложной молекулы, состоящей из четырех пептидных цепей, каждая из которых содержит гем в строго определенном положении. Отсюда можно сделать вывод, что не только вторичная и третичная, но и четвертичная структура определяется особенностями аминокислотных последовательностей полипептидных цепей.

Ряд других крупных белков, в том числе многие ферменты, под действием различных агентов диссоциируют с образованием неактивных субъединиц. Следовательно, хотя биологически активный белок может обладать очень высокой молекулярной массой (от нескольких сотен тысяч до миллиона), составляющие его пептидные цепи могут быть гораздо меньше (табл. 6.2). За образование активных белков при агрегации его субъединиц ответственны те же силы, которые определяют свертывание индивидуальной пептидной цепи в процессе формирования ее нативной конформации.

Электронная микроскопия — удобный метод анализа четвертичной структуры белков, особенно крупных молекул со многими субъединицами. Главное ограничение метода, с одной стороны, сравнительная «прозрачность» белков по отношению к пучку электронов, а с другой — их недостаточная стабильность в условиях бомбардировки электронами и глубокого вакуума. Однако, несмотря на это, обычно удается проводить структурный анализ с разрешением до 2 нм, а при соблюдении определенных предосторожностей — до 1 нм. На рис. 6.16 изображены электронные микрофотографии (электронограммы) фермента аспаратат-транскарбамоил-азы *E. coli*, состоящей из 12 субъединиц, 6 из которых имеют молекулярную массу 17 000 (R-субъединицы), а 6 других — 33 500 (С-субъединицы). Необходимо отметить, что тримеры С-субъединиц также проявляют ферментативную активность и в комбинации с димерами R-субъединиц образуют молекулу с субъединичной структурой $(R_2)_3(C_3)_2$ (разд. 8.7.1). Исходя из этих данных, а так-

же данных электронной микроскопии, была предложена модель четвертичной структуры фермента (рис. 6.16).

Электронная микроскопия широко используется для изучения вирусов, причем данные о размерах последних позволяют выявить существенные детали их структуры. На рис. 6.17 представлена электронная микрофотография вируса желтой мозаики репы, а также построенная на этой основе модель вируса, состоящая из расположенных на его поверхности 32 структурных единиц, 12 из которых представляют собой циклические системы из 5 субъединиц, а 20 — циклические системы из 6 субъединиц. В целом в состав вируса входит 180 белковых субъединиц с молекулярной массой 21 000 каждая (табл. 6.2).

6.7. Белки-предшественники и ансамбли белков

Многие полипептиды и белки синтезируются в виде цепей, имеющих большее число аминокислотных остатков, чем конечные функционально-активные структуры, присутствующие в клетке или секретируемые в кровь и другие жидкости организма. Так называемый «процессинг» этого предшественника с образованием более короткого белка осуществляется с участием ряда протеолитических ферментов. Здесь будет приведено лишь несколько примеров таких превращений, более подробная информация представлена в последующих главах. Один из примеров *зимогенов* (неактивных предшественников протеолитических ферментов) — трипсиноген, который при гидролизе одной пептидной связи превращается в активный фермент — трипсин (гл. 8). Фибриноген представляет собой растворимый белок плазмы крови, превращающийся в результате протеолиза в нерастворимый фибрин кровяных сгустков, предохраняющих организм от больших потерь крови при поражении кровеносных сосудов (гл. 29). Проинсулин, состоящий из одной полипептидной цепи с внутримолекулярными дисульфидными мостиками, в результате протеолиза дает активный инсулин, состоящий из двух пептидных цепей и образующийся за счет выщепления внутреннего пептидного сегмента из полипептидной цепи предшественника (гл. 46). Наконец, состоящий из трех цепей нерастворимый фибриллярный белок, коллаген, образуется в результате протеолитического расщепления предшественников, имеющих более длинные аминокислотные последовательности (с дополнительными пептидными сегментами в NH_2 - и COOH -концевых частях), чем цепи коллагена (гл. 38). Эти примеры иллюстрируют также возможные пути участия протеаз в контроле биологических процессов.

6.8. Спектральные методы обнаружения конформационных переходов в белках

6.8.1. Спектры поглощения

Белки, как правило, поглощают УФ-излучение в трех областях: >250 нм (с пиком вблизи 280 нм), где поглощение определяется исключительно присутствием остатков ароматических аминокислот (разд. 4.2.1), при 210–250 нм, где поглощение определяется присутствием ароматических и других аминокислотных остатков, а также наличием водородных связей и других взаимодействий, зависящих от конформации белка и содержания в молекуле α -спиралей, и <210 нм главным образом благодаря поглощению пептидными связями, а также в связи с различными конформационными факторами. Очевидно, что поглощение УФ-излучения белками в двух последних областях длин волн имеет весьма сложную природу.

Поскольку полоса поглощения тирозиновых остатков претерпевает заметный сдвиг с ростом pH благодаря ионизации фенольных групп, а в случае остатков триптофана такой сдвиг не имеет места, спектрофотометрический метод можно использовать для оценки числа этих остатков в белках. Во многих белках обычно ионизируется лишь часть остатков тирозина, в то время как полная ионизация всех тирозинов наблюдается лишь при денатурации (разд. 4.2.1). Следовательно, изменения в спектрах поглощения могут быть использованы для оценки изменений в химическом окружении ароматических остатков и конформационных изменений в белках в целом. Изменение состояния белка и его хромофоров удобно исследовать путем снятия дифференциальных спектров, т. е. путем прямой регистрации разности поглощения белка при двух различных условиях, например при изменении pH, добавлении мочевины и т. д. Изменения в дифференциальных спектрах нативных и денатурированных белков обычно в ~ 10 раз выше в области 230 нм, чем в области 280 нм.

6.8.2. Оптическое вращение белков

Растворы всех белков способны вращать плоскость поляризации света, проходящего через них. Это происходит, в частности, вследствие присутствия в молекулах белков остатков оптически активных аминокислот. В то же время изучение даже сравнительно простых молекул показывает, что знак и величина оптического вращения зависят не только от природы атомов и групп, связанных с асимметрическими атомами углерода, но и от взаимного расположения асимметрических углеродных атомов. Отсюда следует, что изменение в структуре или конформации белковых молекул может отражаться на величине его удельного вращения.

Удельное оптическое вращение белков всегда отрицательно и для глобулярных белков лежит в области от -30 до -50° . Например, удельное вращение $[\alpha]_D$ растворов овальбумина с pH 3,5 до 11 равно приблизительно -30° , хотя эффективный заряд молекулы изменяется при этих pH от $+20$ до -30 . Следовательно, ионизация молекулы мало или совсем не влияет на ее удельное вращение. Однако при более высоких или более низких pH значение удельного вращения становится более отрицательным. Например, при pH 13 $[\alpha]_D$ равно около -60° . Аналогично в 8 М растворе мочевины $[\alpha]_D = -85^\circ$. Такое же увеличение отрицательного удельного вращения белков наблюдается и при повышении температуры. Если возрастание отрицательного вращения белков не сопровождается разрывом пептидных связей, оно всегда свидетельствует об изменении конформации белка, в основе которого лежат изменения в его вторичной и третичной структурах.

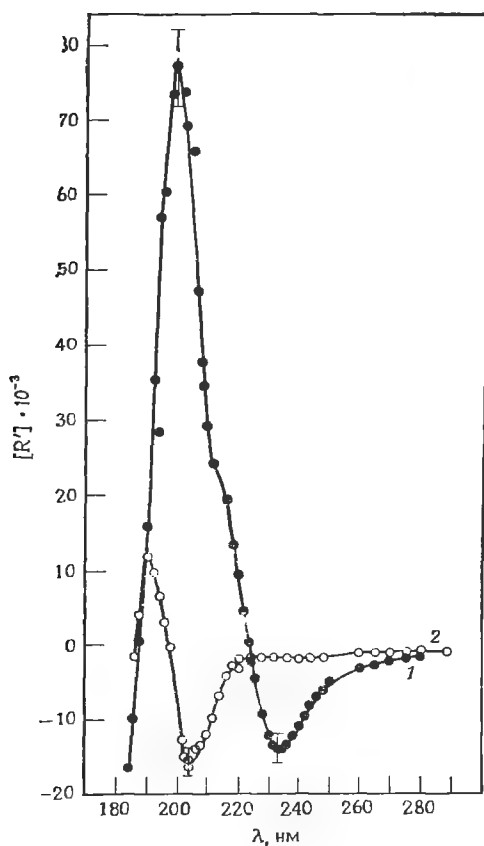


Рис. 6.18. Дисперсия оптического вращения в УФ-области для спиральной конфигурации поли- α -L-глутаминовой кислоты в воде при pH 4,3 (1) и конформации упорядоченного клубка для ее натриевой соли при pH 7,1 (2). На оси ординат отложены величины оптического вращения на один аминокислотный остаток. [Blout E. R., Schmier I., Simmons N. S., J. Am. Chem. Soc., 84, 3193, 1962.]

6.8.3. Дисперсия оптического вращения

Этот метод, основанный на изменении оптического вращения с изменением длины волн монохроматического света, дает дополнительную информацию о структуре белка. Для синтетических полипептидов, таких, как поли-L-глутаминовая кислота, кривые дисперсии различны для конформаций неупорядоченного клубка, образующегося при pH 7 и спиральной конформации, образующейся при pH 4,3 (рис. 6.18). Различие кривых дисперсии обнаружено также для нативных и денатурированных белков. Для расчета процентного содержания спиральных форм в белках используются различные формулы, выведенные теоретическим или эмпирическим путем. Однако в настоящее время приходится констатировать, что такого рода методы не могут давать точных абсолютных значений, а способны лишь регистрировать изменения в содержании α -спиральных форм у глобулярных белков, многие из которых имеют всего 0—10%, а другие — до 70—80% аминокислотных остатков в этой конфигурации. Эти методы представляют особую ценность при наблюдении конформационных переходов в белках, в то время как точное определение конформации и процента спиральности достигается сейчас лишь на основе данных рентгеноструктурного анализа.

6.8.4. Круговой дихроизм

Этим методом измеряется *разность в поглощении* левого и правого циркулярно-поляризованных лучей света. В области оптически активных полос поглощения кривые дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма имеют характеристические экстремумы, показанные на рис. 6.19. Оба явления, иллюстрирующие как неравные скорости пропускания света (дисперсия оптического вращения, ДОВ), так и неодинаковое его поглощение (круговой дихроизм, КД), получили название *эффектов Коттона*. Такого рода эффекты Коттона в простых белках ассоциируются с наличием у полипептидов полос поглощения в областях 190—240 нм (пептидная связь) и 280—290 нм (где доминируют полосы поглощения ароматических боковых цепей триптофана и тирозина). Форма и амплитуда кривых ДОВ и КД очень зависят от конформации белков, а также химического окружения хромофоров боковых цепей.

6.9. Денатурация белков

Под денатурацией понимают широкий спектр структурных изменений в белках, а также различные способы воздействия на ин-

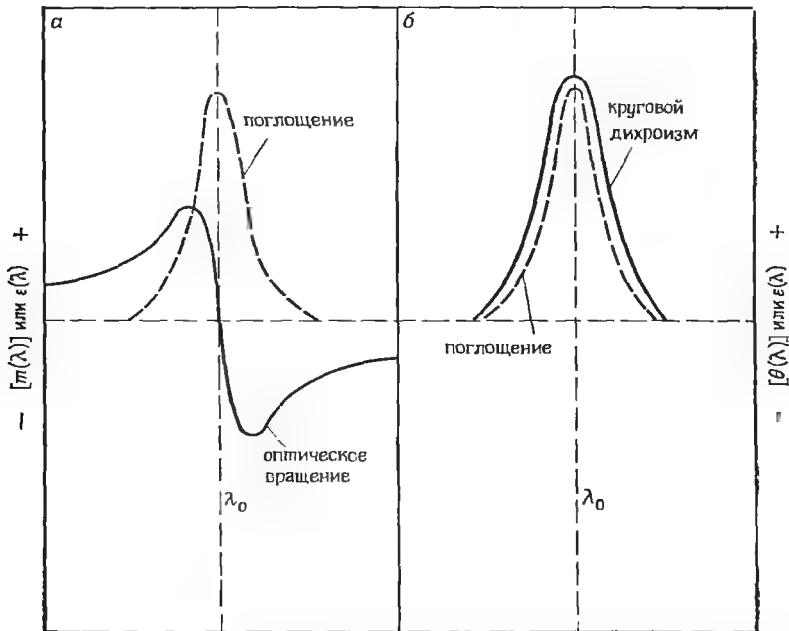


Рис. 6.19. Теоретические соотношения оптически активных полос поглощения света и оптического вращения (а), а также оптически активных полос поглощения и кругового дихроизма (б). $m(\lambda)$ — молярное оптическое вращение при длине волны λ ; $\epsilon(\lambda)$ — коэффициент экстинкции полосы поглощения; $\theta(\lambda)$ — эллиптичность или разность поглощения левого и правого циркулярно-поляризованных лучей света. [Beychok S., Science, 154, 1288, 1966.]

дивидуальные белки. С химической точки зрения денатурация представляет собой сложный процесс, а точное описание характера взаимодействия белка и денатурирующего агента, приводящего к изменению конформации, не всегда возможно. Во всяком случае, все денатурирующие агенты в той или иной мере разрушают нековалентную структуру нативного белка. Для одних белков незначительные изменения в конформации не всегда приводят к потере биологической активности, а для других даже незначительные конформационные перестройки, не всегда фиксируемые обычными методами, могут вести к полной инактивации белка.

Наиболее распространенные денатурирующие агенты — гуанидингидрохлорид и мочевины. Большинство белков оказываются полностью денатурированными в водных 6—8 М растворах гуанидингидрохлорида и в 8—10 М растворах мочевины. В этих условиях нативная конформация обычно полностью разрушается и белок принимает конформацию неупорядоченного клубка, в которой отсутствуют нековалентные взаимодействия между атомами и группами, а все пространственные формы молекулы оказываются легко взаимопревращающимися и способными вступать в контакт с растворителем. Гидрофобные R-группы белков в концентрированных растворах мочевины и гуанидингидрохлорида становятся менее экранированными, и, следовательно, денатурация такого рода вызывает нарушение гидрофобных взаимодействий. Это согласуется с фактом повышенной растворимости гидрофобных соединений в концентрированных водных растворах мочевины и гуанидингидрохлорида.

Неводные растворители, по всей вероятности, также способны денатурировать белки, вызывая нарушения гидрофобных взаимодействий; это имеет место, например, в водно-спиртовых растворах. В некоторых неводных растворителях белки часто приобретают конформацию с большим содержанием спиралей. Детергенты образуют с полипептидами прочные комплексы, вызывая глубокие структурные перестройки, как это было уже показано на примере додецилсульфата натрия (разд. 5.1.7).

Денатурация растворенных белков обычно происходит при температуре 50—60 °C и требует различного времени, но точное значение температуры, вызывающей конформационный переход, варьируется в широких пределах для различных белков. Например, некоторые ферменты инактивируются даже при охлаждении от 30 до 0 °C (*холод-лабильные ферменты*). Тепловая денатурация часто оказывается обратимой, но во многих случаях агрегация белка сопровождается его осаждением из раствора. Причиной денатурации белков может быть также изменение pH. Понятно, что характер электростатических взаимодействий в полипептидных цепях белков существенным образом зависит от pH. Однако весьма сложно объяснить, почему данный белок денатурирует при одном значении

pH, а не при другом. Например, пепсин ($pI < 1$) денатурирует быстро при нейтральных pH, а рибонуклеаза ($pI = 7.8$) и лизоцим ($pI = 10.6$) не претерпевают конформационных перестроек даже при pH 2. Большинство белков устойчиво лишь в достаточно узкой области pH.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

- Alexander P., Lundgren H. P.*, eds., *A Laboratory Manual of Analytical Methods in Protein Chemistry Including Polypeptides*, vol. 4, Pergamon Press, New York, 1966.
- Anfinsen C. B., Jr., Anson M. L., Edsall J. T., Richards F. M.*, eds. *Advances in Protein Chemistry*, Academic Press, Inc., New York. (Ежегодное издание, том I которого опубликован в 1944 г.)
- Bailey J. L.*, *Techniques of Protein Chemistry*, 2d ed., American Elsevier Publishing Company, Inc., New York, 1967.
- Bier M.*, *Electrophoresis*, 2d ed., Academic Press Inc., New York, 1968.
- Bodanszky M., Klausner Y. S., Ondetti M. A.*, *Peptide Synthesis*, 2nd ed., Interscience Publishers, division of John Wiley & Sons, Inc., New York, 1976.
- Cohn E. J., Edsall J. T.*, *Proteins, Amino Acids, and Peptides as Ions and Dipolar Ions*, Reinhold Publishing Corporation, New York, 1942.
- Dayhoff M.*, ed., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5, National Biomedical Research Foundation, 1972; Supplement 1 to vol. 5, and Supplement 2 to vol. 5. (В сборнике приведены последовательности белков и нуклеиновых кислот, опубликованные до 1976 г. включительно.)
- Dickerson R. E., Geis I.*, *The Structure and Action of Proteins*, W. A. Benjamin, Inc., Publishers, Menlo Park, Calif., 1969.
- Edsall J. T., Wyman J.*, *Biophysical Chemistry*, vol. I, Thermodynamics, Electrostatics, and the Biological Significance of the Properties of Matter, Academic Press, Inc., New York, 1958.
- Fasman G. D.*, ed., *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology: Proteins*, 3 vols., 3d ed., The Chemical Rubber Co. Press, Cleveland, Ohio, 1976.
- Heftmann E.*, ed., *Chromatography*, 3d ed., Reinhold Publishing Corporation, New York, 1975.
- Hirs C. H. W.*, ed., *Enzyme Structure*, in: S. P. Colowick, N. O. Kaplan, eds., *Methods in Enzymology*, vol. XI, Academic Press, Inc., New York, 1967.
- Hirs C. H. W., Timashoff S. N.*, eds. *Methods in Enzymology*, vol. XXV, pt. B, Academic Press, Inc., New York, 1972.
- Means G. E., Feeney R. E.*, *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day, Inc., Publisher, San Francisco, 1971.
- Meister A.*, *Biochemistry of the Amino Acids*, 2d ed., 2 vols., Academic Press, Inc., New York, 1965.
- Neurath H.*, ed., *The Proteins: Composition, Structure and Function*, 2d ed., vols. I—V, Academic Press, Inc., New York, 1963—1968.
- Neurath H., Hill R. L.*, eds., *The Proteins*, 3d ed., vols. I—III, Academic Press, Inc., New York, 1975—1977.
- Reich E., Rifkin D. B., Shaw E.*, eds., *Proteases and Biological Control*, Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation, vol. 2, Cold Spring Harbor, N. Y., 1975.
- Schachman H. K.*, *Ultracentrifugation in Biochemistry*, Academic Press, Inc. New York, 1959.
- Schröder E., Lübke K.* *The Peptides*, 2 vols., Academic Press, Inc., New York, 1965—1966.
- Schroeder W. E.*, *The Primary Structure of Proteins*, Harper & Row, Publishers, Incorporated, New York, 1968.

Svedberg T., Pedersen K. O., The Ultracentrifuge, Oxford University Press, Fair Lawn, N. J., 1940.

Tanford C., Physical Chemistry of Macromolecules, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1961.

Tanford C., The Hydrophobic Effect, Wiley-Interscience, New York, 1973.

Williams C. A., Chase M. W., eds., Methods in Immunology and Immunochemistry, 3 vols., Academic Press, Inc., New York, 1967—1971. (Это издание содержит отличные краткие обзоры, касающиеся многих методов, применяющихся в химии белка.)

Williams J. W., ed., Ultracentrifugation Analysis, Academic Press, Inc., New York, 1963.

Work T. S., Work E. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, North-Holland Publishing Company, Amsterdam. (Публикация этой серии начата в 1969 г. и продолжается в настоящее время.)

Обзорные статьи

Beychok S., Circular Dichroism of Biological Macromolecules, Science, **154**, 1288—1299, 1966.

Hartley B. S., Strategy and Tactics in Protein Chemistry, Biochem. J., **119**, 805—822, 1970.

Heinrikson R. L., Kromer K. J., Recent Advances in the Chemical Modification and Covalent Structural Analysis of Proteins, Progr. Bioorg. Chem., **3**, 141—265, 1974.

Holmes K. C., Blow D. M. The Use of X-ray Diffraction in the Study of Protein and Nucleic Acid Structure, Methods Biochem. Anal., **13**, 113—239, 1965.

Kendrew J. C., The Three-dimensional Structure of a Protein Molecule, Sci. Am., **205**, 96—110, December 1961.

Phillips D. C., The Three-dimensional Structure of an Enzyme Molecule, Sci. Am., **215**, 78—90, November 1966.

Vickery H. B., The History of the Discovery of the Amino Acids, II: a Review of Amino Acids Described since 1931 as Components of Native Proteins, Adv. Protein Chem., **26**, 81—171, 1972.

Vickery H. B., Schmidt C. L. A., The History of the Discovery of the Amino Acids, Chem. Revs., **9**, 169—318, 1931.

Глава 7

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Структура и свойства

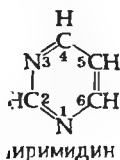
Нуклеиновые кислоты могут быть разделены на два класса: рибонуклеиновые кислоты (РНК), содержащие рибозу, и дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), в состав которых входит дезоксирибоза. Те и другие являются линейными полимерами *нуклеотидов* (см. ниже), образующимися с помощью фосфодиэфирных связей между 5'-фосфатом одного нуклеотида и 3'-гидроксидной группы сахара соседнего нуклеотида.

7.1. Компоненты нуклеиновых кислот

Нуклеотиды состоят из трех компонентов: пиримидинового или пуринового основания, связанного с углеводом (рибозой или дезоксирибозой), и фосфата, этерифицирующего сахар по атомам С-2', С-3' или С-5'. Этерификация по С-5' наиболее распространена.

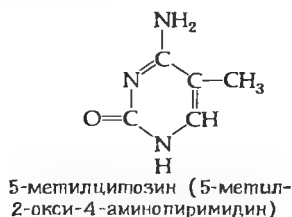
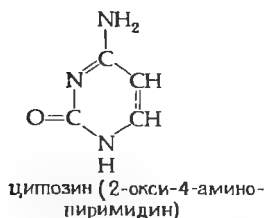
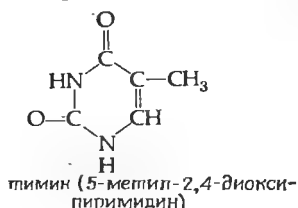
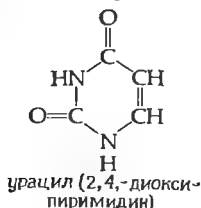
7.1.1. Пиримидины

Все пиримидины являются производными гетероциклического соединения — *пиримидина*. Его структура и общепринятая нумерация атомов в кольце указаны ниже:

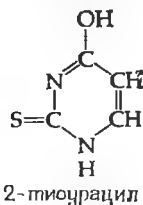
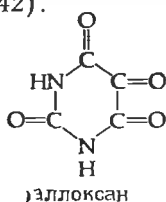


Основные пиримидины, найденные в РНК,— урацил и цитозин; в ДНК — тимин и цитозин. В некоторых нуклеиновых кислотах

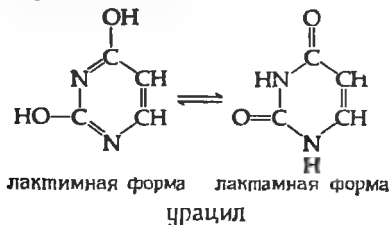
найлены метилированные и другие производные пириимидина (разд. 7.3.1).



Биологическая роль пириимидинов не ограничена нуклеиновыми кислотами. Некоторые пириимидиновые нуклеотиды играют важную роль в процессах обмена углеводов и липидов (часть третья). Витамин В₁ (тиамин) — пириимидиновое производное (гл. 12). В последние годы некоторые синтетические пириимидины широко используются в качестве биорегуляторов. Аллоксан (2,4,5,6-тетраоксипириимидин) вызывает искусственный диабет у животных (гл. 15). Тиоурацил и подобные соединения применяются для лечения гипертиреоза (гл. 42).

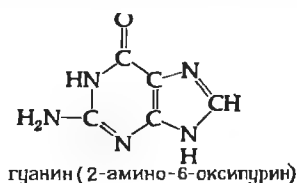
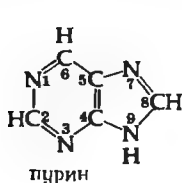


Все пириимидины способны к превращению типа лактим-лактамой таутомерии и могут быть представлены в одной из форм, как показано для урацила. При нейтральных и кислых значениях pH лактамная форма преобладает.

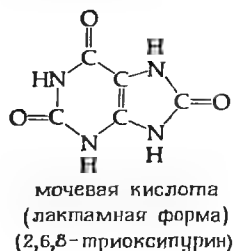
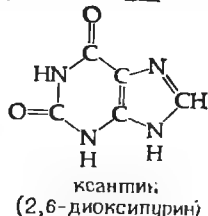
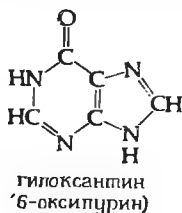


7.1.2. Пурины

Пурин, давший название всей группе, содержит шестичленное пиримидиновое кольцо, сочлененное со вторым кольцом, образованным еще двумя атомами азота и одним атомом углерода. Аденин и гуанин — основные пурины обоих типов нуклеиновых кислот.



Более ограниченное распространение имеют гипоксантин и различные метилированные и другие производные аденина и гуанина (разд. 7.3.1). Другими важными пуринами являются ксантин и мочева́я кислота.

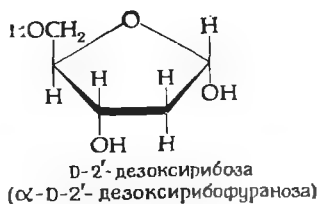
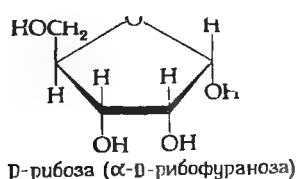


Подобно пиримидинам, пурины склонны к лактим-лакта́мной таутомерии, показанной выше для моче́вой кислоты. Лактимная форма моче́вой кислоты является слабой кислотой ($pK'_1=4,5$; $pK'_2=10,3$) и образует соли, такие, как одно- и двухзамещенные натриевые или калиевые ураты. Мочевая кислота и ее соли умеренно растворимы в воде. Это свойство лежит в основе последовательного осаждения уратов из мочи при стоянии (гл. 35).

Кофеин (1,3,7-триметилксантин) найден в кофе, чае и других растениях; теобромин (3,7-диметилксантин) встречается в чае и какао. Другие пурины также найдены в растениях, и некоторые из них, подобно кофеину и теобромину, обладают важными фармакологическими свойствами.

7.1.3. Углеводы

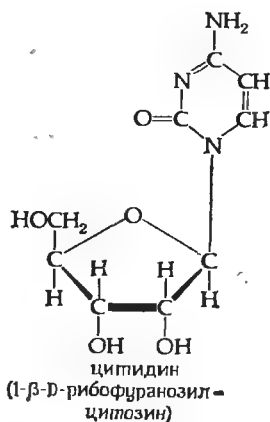
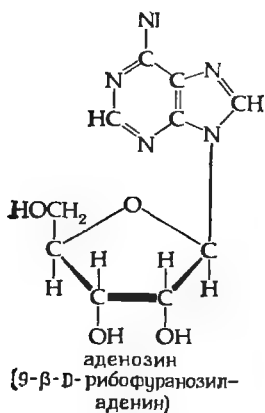
Углемодом в РНК является D-рибоза, которая находится в фуранозной форме (гл. 2). Сахарный компонент ДНК — D-2-дезоксирибоза.



7.1.4. Нуклеозиды

Комбинация пурина или пиримидина с пентозой приводит к *нуклеозиду*. Аденин, связанный с рибозой, называется аденозином, гуанинрибонуклеозид — гуанозином и соответственно пиримидиновые рибонуклеозиды — цитидином и уридином. Аналогичные нуклеозиды, образованные дезоксирибозой, — дезоксирибонуклеозиды: адениндезоксирибонуклеозид (или дезоксиаденозин), дезоксицитидин и т. д. Отметим, что дезоксирибонуклеозид тимина, который находится преимущественно в ДНК, называется тимидином, но не дезокситимидином. Тимин также встречается в одном из видов РНК, именуемой транспортной РНК (разд. 7.3.1.1). В этом случае используется название тиминрибонуклеозид или рибозилтимин.

Пуриновые нуклеозиды, полученные из РНК, имеют β -гликозидную связь C-1' атома углевода с азотом в положении 9, как это показано для аденозина. Пиримидиновые нуклеозиды являются N-1-гликозидами, как показано для цитидина.



Подобно О-гликозидам, такого рода N-гликозиды стабильны в щелочах. Пуриновые нуклеозиды легко гидролизуются кислотой, в то время как пиримидиновые нуклеозиды гидролизуются лишь после достаточно продолжительной обработки концентрированной кислотой.

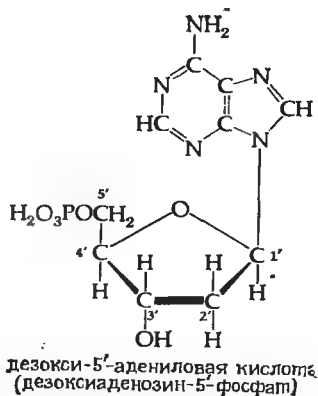
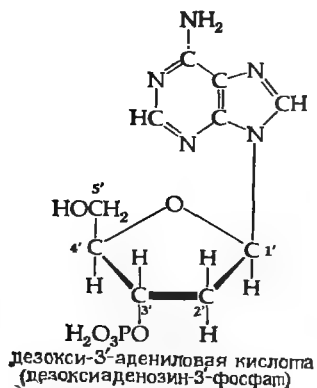
Нуклеозиды, содержащие дезоксирибозу, имеют тот же тип гликозидных связей и являются 9-β-D-2'-дезоксирибофуранозидами гуанина и аденина и 1-β-D-2'-дезоксирибофуранозидами цитозина и тимина. Согласно номенклатуре нуклеозидов и их производных, номера атомов, помеченные штрихом, указывают на положение заместителей в углеводном остатке.

Свободный токсичный нуклеозид, *небуларин* (9-β-D-рибофуранозилпурин), выделен из гриба *Agaricus nebularis*. Это первое природное соединение, в котором пуриновое ядро имеет заместитель только в положении 9. Свободный пурин не найден в природных источниках. Среди других необычных нуклеозидов, встречающихся в природе, отметим антибиотики, некоторые из которых ингибируют белковый синтез (гл. 26).

7.1.5. Нуклеотиды

Как фосфорные эфиры нуклеозидов *нуклеотиды* являются сильными кислотами. Они называются, соответственно, адениловой, гуаниловой, тимидиловой, цитидиловой и уридиловой кислотами.

Фосфорилирование сахарного остатка дезоксирибонуклеозида возможно только по положениям С-3' и С-5', так как атомы С-1' и С-4' включены в фуранозное кольцо, а атом С-2' не имеет гидроксидной группы. Оба типа замещенных фосфатов найдены в дезоксирибонуклеозидах, выделенных после гидролиза ДНК. Ниже показано строение дезокси-3'-адениловой кислоты и дезокси-5'-адениловой кислоты:



Дезоксигуаниловая, тимидиловая и дезокситидиловая кислоты, этерифицированные в положениях 3' и 5', также обнаруживаются в гидролизатах ДНК.

В РНК только положения 1' и 4' недоступны для этерификации, замещение же по С-2', С-3' и С-5' возможно. Щелочной гидролиз приводит к изомерным нуклеотидам, этерифицированным по С-2' или С-3'. Ферментативный гидролиз может дать либо нуклеозид-3'-фосфаты, либо нуклеозид-5'-фосфаты. Значение различных изомеров нуклеотидов обсуждается ниже.

Все клетки содержат свободную форму адениловой кислоты — аденозин-5'-фосфат, а также полифосфатные производные — аденозин-5'-дифосфат и аденозин-5'-трифосфат. Аналогично широко распространены нуклеозид-5'-моно-, нуклеозид-5'-ди- и нуклеозид-5'-трифосфаты других пуриннов и пиримидинов, являющиеся производными как рибозы, так и дезоксирибозы. Некоторые из этих моно-,

Таблица 7.1

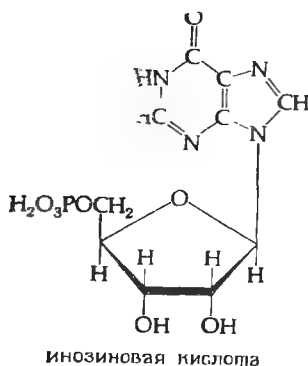
Номенклатура и принятые сокращения для нуклеотидов^а

Нуклеотид	Сокращение
Аденозинмонофосфат (адениловая кислота)	AMP
Аденозиндифосфат	ADP
Аденозинтрифосфат	ATP
Гуанозинмонофосфат (гуаниловая кислота)	GMP
Гуанозиндифосфат	GDP
Гуанозинтрифосфат	GTP
Цитидинмонофосфат (цитидиловая кислота)	CMP
Цитидиндифосфат	CDP
Цитидинтрифосфат	CTP
Уридинмонофосфат (уридиловая кислота)	UMP
Уридиндифосфат	UDP
Уридинтрифосфат	UTP
Тиминрибонуклеозидмонофосфат (риботимидиловая кислота)	TMP
Дезоксиаденозинмонофосфат (дезоксиадениловая кислота)	dAMP
Дезоксигуанозинмонофосфат (дезоксигуаниловая кислота)	dGMP
Тимидинмонофосфат (тимидиловая кислота)	dTMP
Дезокситидинмонофосфат (дезокситидиловая кислота)	dCMP

^а Приведена номенклатура только для 5'-замещенных производных. Другие монофосфаты — 3'-AMP, 2'-AMP, 3'-GMP и т. д. Дополнительные сокращения и символы см. в табл. 7.6 и в работе [J. Biol. chem., 245, 5171, 1970].

ди- и трифосфатов и принятые для них сокращения приведены в табл. 7.1. Роль этих соединений в процессах метаболизма обсуждается в части третьей.

В тканях, а также в некоторых нуклеиновых кислотах найден также продукт дезаминирования адениловой кислоты — инозиновая кислота (9- β -5'-фосфо-D-рибозилгипоксантин):



7.1.6. Методы исследования нуклеиновых кислот и их компонентов

7.1.6.1. Выделение нуклеиновых кислот

Нуклеиновые кислоты, присутствующие в тканях в качестве нуклеопротеиновых комплексов с основными белками, могут быть выделены либо прямой экстракцией, либо путем экстракции соответствующих нуклеопротеинов, обычно 1 М растворами солей. Растворимые нуклеопротеины диссоциируют при насыщении раствора хлоридом натрия, который при этом осаждает белки, а в случае ДНК — изопикническим центрифугированием нуклеопротеина (разд. 7.2.7). Белки могут быть также отделены от нуклеиновых кислот экстракцией фенолом или обработкой детергентами, такими, как додецилсульфат натрия. После отделения белка нуклеиновую кислоту можно осадить, медленно добавляя спирт.

7.1.6.2. Идентификация ДНК и РНК

Для определения типа нуклеиновой кислоты необходимо идентифицировать сахар. Наиболее часто применяемыми методами являются колориметрические; их можно использовать для количественного определения углеводов как таковых или, соответственно модифицировав методику, для определения нуклеиновых кислот, нуклеотидов и других производных.

Некоторые из методов определения пентозы основаны на высвобождении фурфурола после нагревания с HCl (разд. 2.2.6.3). Фурфурол дает красное окрашивание с ацетатом анилина или желтое окрашивание с *p*-бромфенилгидразином. Рибоза дает характерную окраску после реакции с орцином в соответствующих условиях (табл. 2.1).

Если ДНК нагревать с дифениламином в кислом растворе, то наблюдается синее окрашивание. При реакции Фойльгена (табл. 2.1) дезоксирибоза или ДНК после частичного кислотного гидролиза дают сине-фиолетовую окраску.

7.1.6.3. Спектры поглощения

Циклические системы пуринов и пиримидинов в нуклеиновой кислоте содержат сопряженные двойные связи и обладают заметным поглощением в УФ-области спектра с максимумом поглощения вблизи 260 нм. Поскольку белки характеризуются гораздо более слабым поглощением в этой области (не более 1—2%), спектральные свойства нуклеиновых кислот удобны для идентификации и количественного определения этих веществ в клетках и тканях. Фотография клеток при УФ-освещении зависит в основном от сильного поглощения нуклеиновыми кислотами и позволяет, например, без окрашивания изучать поведение хромосом в живых клетках. Применение такой методики в сочетании с использованием высокоочищенных ферментов, расщепляющих нуклеиновые кислоты или белки, позволяет точно локализовать нуклеиновые кислоты.

7.1.6.4. Разделение и анализ нуклеотидов

Для разделения пуриновых и пиримидиновых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов используются различные хроматографические методы. В случае нуклеотидов используется также электрофорез. Эти методы пригодны и для разделения производных рибозы и дезоксирибозы. Разделение нуклеотидов зависит от присутствия в пуринах и пиримидинах способных к ионизации групп, а именно соевых гидроксидных групп урацила, тимина и гуанина с pK' в интервале от 9 до 12,5 и аминогрупп аденина, гуанина и цитозина с pK' между 2 и 4,5. Кроме того, все нуклеотиды обладают двумя кислотными группами замещенной фосфорной кислоты с $pK'_1 \sim 1$ и $pK'_2 \sim 6$.

7.2. Структура дезоксирибонуклеиновых кислот

7.2.1. Межнуклеотидные связи

Дезоксирибонуклеиновые кислоты являются полинуклеотидами, в которых фосфатные остатки каждого нуклеотида служат мостиками при образовании фосфодиэфирных связей между остатками дезоксирибозы. Доказательство того, что межнуклеотидные связи находятся между атомами С-3' и С-5', получено при изучении ферментативных гидролизатов ДНК. Последовательный гидролиз ДНК панкреатической *дезоксирибонуклеазой* (ДНАзой) и *фосфодиэстеразой* змеиного яда дает смесь дезоксирибонуклеозид-5'-фосфатов. Комбинированное действие ДНАзы и фосфодиэстеразы селезенки приводит к дезоксирибонуклеозид-3'-фосфатам. Таким образом, ДНК является длинноцепочечным полимером с диэфирными межнуклеотидными связями между атомами С-3' и С-5', как показано на рис. 7.1 для фрагмента цепи ДНК.

Для построения схематической структуры ДНК служит следующий способ (рис. 7.1). Горизонталы изображают углеродные цепи сахаров с основаниями, присоединенными по С-1', а диагонали — фосфодиэфирные связи между атомом С-3' (вблизи середины горизонтальной линии) и атомом С-5' (конец следующей горизонтальной). Такое графическое изображение структуры используется и для ДНК, и для РНК.

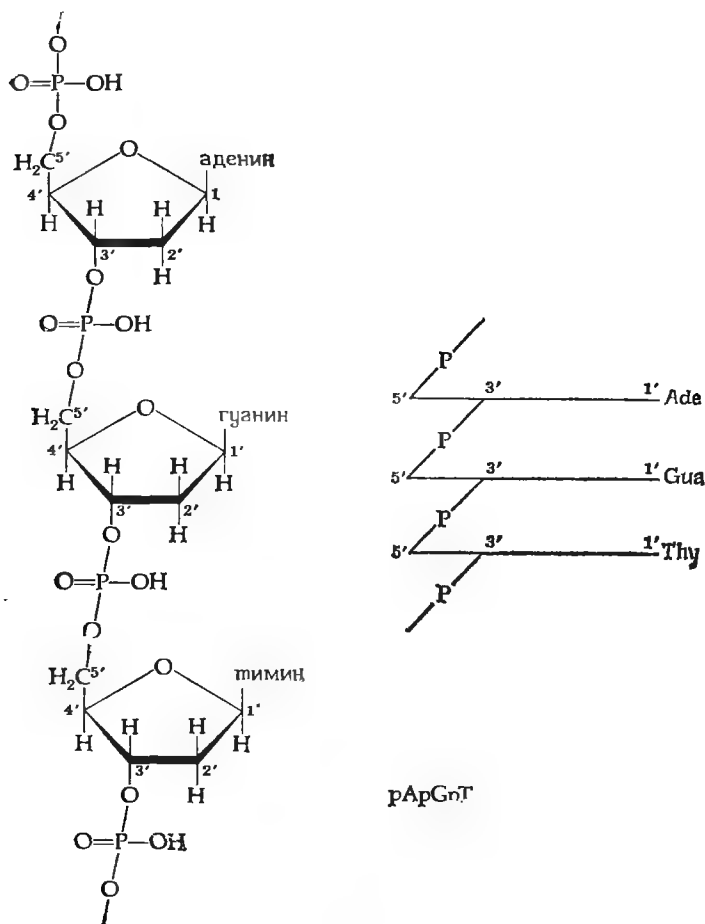


Рис. 7.1. Изображение фрагмента цепи ДНК, показывающее положение межнуклеотидной связи между атомами С-3' и С-5'. Справа — схема данного фрагмента.

Для длинных полинуклеотидных последовательностей применяется также буквенная система. Буквами А, G, С, U и Т обозначают нуклеозиды. Фосфатная группа обозначается буквой р. Когда она находится справа, этерифицирована группа при С-3', когда слева — группа С-5'. Так, ApUp — это динуклеотид с фосфомоноэфирной группой при С-3' уридина и фосфодиэфирной связью между С-5' для U и С-3' для А. Если не очевидно, что обсуждаются дезокси-нуклеотиды, полезно точно подчеркнуть это, например d-ApTpGrTp и т. д. или d-ATGT и т. д., указывая, что эти нуклеозиды содержат дезоксирибозу.

7.2.2. Состав ДНК

Табл. 7.2 показывает состав оснований в ДНК из различных образцов. Эти и ряд других данных обнаруживают существенные закономерности строения ДНК. Во всех случаях количество пуринов (Pur) эквивалентно количеству пиримидинов (Pyg), т. е. отношение Pur/Pyg равно единице, так же как отношение количества аденина

Таблица 7.2
Состав ДНК из различных образцов^a

Образец	Состав оснований ^б , мол. %				$\frac{A+T}{G+C}$	$\frac{A}{T}$	$\frac{G}{C}$	$\frac{Pur}{Pyg}$
	G	A	C	T				
<i>Sarcina lutea</i>	37,1	13,4	37,1	12,4	0,35	1,03	1,00	1,02
<i>Alcaligenes faecalis</i>	33,9	16,5	32,8	16,8	0,50	0,98	1,03	1,02
<i>Brucella abortus</i>	20,0	21,0	23,9	21,1	0,73	1,00	1,00	1,00
<i>E. coli</i> K12	24,9	26,0	25,2	23,9	1,00	1,09	0,99	1,08
Проростки пшеницы	22,7	27,3	22,8 ^в	27,1	1,19	1,01	1,00	1,00
Тимус быка	21,5	28,2	22,5 ^в	27,8	1,27	1,01	0,96	0,99
Печень человека	19,5	30,3	19,9	30,3	1,54	1,00	0,98	0,99
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18,3	31,7	17,4	32,6	1,80	0,97	1,05	1,00
<i>Clostridium perfringens</i>	14,0	36,9	12,8	36,3	2,70	1,02	1,09	1,04

^a Из работ разных исследователей.

^б G — гуанин, A — аденин, C — цитозин, T — тимин, Pur/Pyg — пурип/пиримидин.

^в Цитозин+метилцитозин.

(A) к количеству тимина (T). Аналогично отношение количества гуанина (G) к количеству цитозина (C) (плюс метилцитозин, если он имеется) равно единице. Хотя такие данные приведены только для пуринов и пиримидинов, отношение количеств соответствующих нуклеотидов то же самое, так как на каждый моль основания (пурина или пиримидина) приходится по 1 моль дезоксирибозы и фосфата. Такого рода данные получены для многих образцов ДНК, и указанные закономерности сохраняются. Тем не менее ДНК каждого вида обладает характерным составом, который не зависит от возраста, условий роста, различных факторов развития и т. п. В самом деле, образцы ДНК высших организмов из различных органов или тканей одного вида идентичны по составу.

Состав ДНК из данного источника может быть охарактеризован отношением $(A+T)/(G+C)$. В бактериях наблюдается большой разброс нуклеотидного состава: некоторые имеют высокое со-

держание А+Т, другие — G+C. У высших организмов диапазон этих характеристик более узок; у большинства животных отношение (А+Т)/(G+C) находится в пределах 1,3—1,5, а у высших растений колеблется от 1,1 до 1,7.

Кроме двух пуринов, аденина и гуанина, и двух пиримидинов, цитозина и тимина, в ДНК ряда бактерий идентифицированы незначительные количества 6-метиладенина и 5-метилцитозина. Эти метилированные основания защищают ДНК, в которых они находятся, от атаки рестрикционными дезоксирибонуклеазами (гл. 25). Метилцитозин — также характерный компонент ДНК некоторых высших растений и животных. ДНК растений богаче этим пиримидином, чем ДНК животных. Проростки пшеницы — пока самый богатый источник метилцитозина, содержащий 6 молей метилцитозина на 100 молей оснований. Во всех случаях это основание замещает цитозин. Функция метилцитозина пока неизвестна.

Предложено несколько методов определения последовательности нуклеотидов в ДНК. В частности, удобен один из них, для которого необходимы микрограммовые количества ДНК. Метод включает маркирование 5'-конца полинуклеотидной цепи ^{32}P с последующим специфическим расщеплением по остаткам аденина, гуанина, цитозина и тимина с помощью специальных агентов. Концевое маркирование ДНК осуществляется с помощью полинуклеотидкиназы — фермента, который катализирует перенос ^{32}P с γ - ^{32}P -меченого АТР на 5'-концевую гидроксидную группу. Частичное расщепление по каждому из четырех оснований приводит к набору меченых фрагментов, размеры которых соответствуют числу нуклеотидов от меченого конца до каждого положения данного основания в последовательности. Фрагменты разделяются электрофорезом в полиакриламидном геле (разд. 5.6.4). Последовательное расположение фрагментов по размерам позволяет установить точки расщепления. Радиоавтография геля, полученного для четырех различных способов расщепления, дает картину полос, из которой непосредственно может быть прочитана последовательность. Этот метод позволяет определить последовательность ~ 100 нуклеотидов, начиная с меченого 5'-конца цепи ДНК*.

7.2.3. Действие нуклеаз

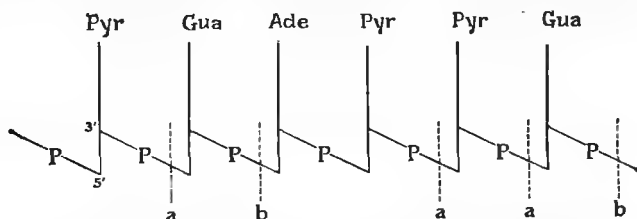
Нуклеазы могут специфически катализировать гидролиз ДНК или РНК, а также соответствующих полинуклеотидов. Эти ферменты подразделяются на два типа: 1) *экзонуклеазы*, для действия которых необходимо наличие свободного конца цепи, и 2) *эндо-нуклеазы*, которые не нуждаются в наличии свободного конца цепи и могут атаковать одну или несколько связей в любом месте полинуклеотида.

Экзонуклеазы могут расщеплять цепь либо с 3'-, либо с 5'-конца, давая моонуклеотиды или смесь моно- и олигонуклеотидов. Они не обладают специфичностью ни к основанию, ни к последова-

* В настоящее время разработаны весьма эффективные методы определения нуклеотидной последовательности ДНК (методы Сенгера, Максана — Гилберта и др.), позволяющие определить структуру цепей из нескольких тысяч нуклеотидов [Шабарова З. А., Богданов А. А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. — М.: Химия. 1978, с. 387]. — *Прим. ред.*

тельности, однако они могут быть высокоспецифичны по их способности атаковать одно- или двухцепочечные полинуклеотиды (см. ниже).

Эндонуклеазы также могут различать одноцепочечные и двухспиральные структуры. В то же время они могут быть специфичны к последовательности оснований, как, например, рестрикционные дезоксирибонуклеазы (гл. 25), или к отдельному основанию. Так, рибонуклеаза (РНаз) панкреатической железы быка гидролизует межнуклеотидные связи у пиримидинов так, что пиримидиновое звено остается этерифицированным по 3'-положению. Точки расщепления этим ферментом показаны вертикальными пунктирными линиями, обозначенными буквой «а» (Pyr — пиримидин).



Конечными продуктами, образующимися в результате действия панкреатической РНазы, являются пиримидин-3'-фосфаты и олигонуклеотиды, оканчивающиеся пиримидин-3'-фосфатом, т. е. ...GpApGpPyrp. Рибонуклеаза T1 из *Aspergillus oryzae* расщепляет РНК, образуя гуанозин-3'-фосфат и олигонуклеотиды, оканчивающиеся гуанозин-3'-фосфатом. Места расщепления (см. выше) обозначены буквой «b». Оба фермента очень широко используются при анализе структуры РНК. Специфичность некоторых нуклеаз приведена в табл. 7.3.

7.2.4. Двухспиральная структура ДНК

Результаты рентгеноструктурного анализа ДНК, опубликованные Вилкинсом, Франклином и сотр., свидетельствуют о том, что нуклеотиды ДНК расположены в форме спирали с периодом идентичности (шагом) 3,4 нм и расстоянием между плоскостями оснований 0,34 нм. На основании этих данных и аналитической информации, представленной выше (табл. 7.2), Уотсон и Крик предложили модель структуры ДНК, в которой две цепи, состоящие из нуклеотидов, соединенных 3',5'-фосфодиэфирными мостиками, сплетены друг с другом, так что на каждый виток спирали приходится 10 пар оснований. Диаметр спирали 2,0 нм. Две цепи удерживаются вместе большей частью за счет водородных связей между каждой аминокгруппой и примыкающей к ней кетогруппой, т. е. между аденином и тиминном, гуанином и цитозином и т. д. Расстояния между гликозидными связями, соединяющими пары основа-

Таблица 7.3
 Специфичность некоторых нуклеаз
 Эндонуклеазы

Фермент	Субстрат	Структура полинуклеотида, число нитей	Продукты
ДНАза I (панкреатическая железа быка)	ДНК	Одна, две	5'-Фосфорилированные олигонуклеотиды
ДНАза II (тимус теленка, селезенка)	ДНК	Одна, две	3'-Фосфорилированные олигонуклеотиды
Эндонуклеаза <i>Neurospora crassa</i>	ДНК, РНК	Одна	Нуклеозид-5'-фосфаты; 5'-фосфорилированные олигонуклеотиды
S ₁ эндонуклеаза (<i>Aspergillus oryzae</i>)	ДНК, РНК	Одна	Нуклеозид-5'-фосфаты; 5'-фосфорилированные олигонуклеотиды
Панкреатическая РНАза	РНК	Одна	Пиримидиновые нуклеозид-3'-фосфаты; олигонуклеотиды, имеющие на конце пиримидиновый нуклеозид-3'-фосфат
РНАза T1 (<i>Aspergillus oryzae</i>)	РНК	Одна	Гуанозин-3'-фосфат; олигонуклеотиды, имеющие на конце гуанозин-3'-фосфат
Рестрикционные эндонуклеазы	«Немодифицированная» ДНК	Две	См. гл. 25

Экзонуклеазы

Фермент	Субстрат	Структура полинуклеотида, число нитей	Атакующий конец	Продукты
Фосфодиэстераза змеиного яда	РНК, ДНК	Одна	3'-	Нуклеозид-5'-фосфаты
Фосфодиэстераза селезенки	РНК, ДНК	Одна	5'-	Нуклеозид-3'-фосфаты
Экзонуклеаза I <i>E. coli</i>	ДНК	Одна	3'-	Нуклеозид-5'-фосфаты и динуклеотиды с 5'-конца ДНК
Экзонуклеаза III <i>E. coli</i>	ДНК	Две	3'-	Нуклеозид-5'-фосфаты и одноцепочечная ДНК
Экзонуклеаза, индуцируемая фагом λ	ДНК	Две	5'-	Нуклеозид-5'-фосфаты и одноцепочечная ДНК

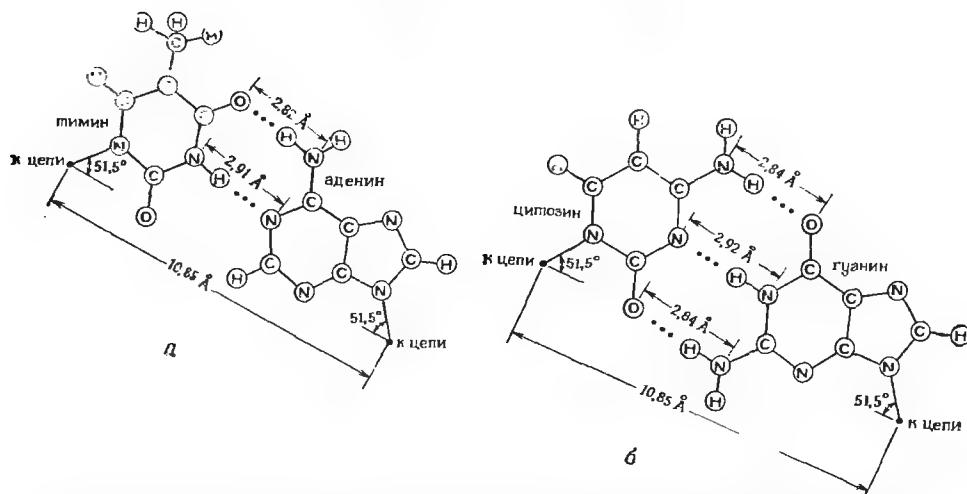


Рис. 7.2. Размеры комплексов и длина водородных связей между тиминном и аденином (а), цитозинном и гуанином (б) в двойной спирали ДНК. [Wilkins M. H., Arnott S., J. Mol. Biol., 11, 291, 1965.]

ний с сахарофосфатным остовом, одинаковы для каждой пары (1,085 нм); эти связи симметрично ориентированы относительно оси второго порядка, расположенной определенным образом по отношению к плоскости пары. Таким образом, соединения между двумя С-1'-атомами на одном и том же уровне спирали могут быть образованы любой из четырех пар оснований А—Т, Т—А, G—C или C—G. Типы водородных связей показаны на рис. 7.2.

Встречаются три сходные формы двуспиральных ДНК: А, В и С. В-форма, описанная выше, по-видимому, является обычной формой, найденной в растворе и *in vivo*. В-форма превращается в А-форму, когда влажность препарата ДНК снижается до $< 75\%$. А-форма отличается от В-формы тем, что пары оснований не перпендикулярны оси спирали, а наклонены под углом $\sim 20^\circ$. В результате шаг спирали уменьшается с 3,4 до 2,8 нм. В А-форме имеется 11 пар оснований на виток, что приводит к укорачиванию цепи приблизительно на 25%. С-форма, очень сходная с В-формой, имеет шаг спирали 3,3 нм и 9 пар оснований на виток.

Две цепи ДНК не идентичны, но *комплементарны*, что означает спаривание соответствующих оснований (А с Т, G с C), как показано для гипотетического фрагмента двух цепей ДНК (где буквы означают дезоксирибонуклеозиды):

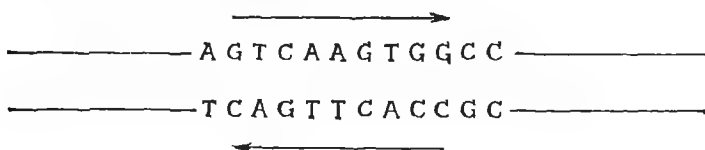
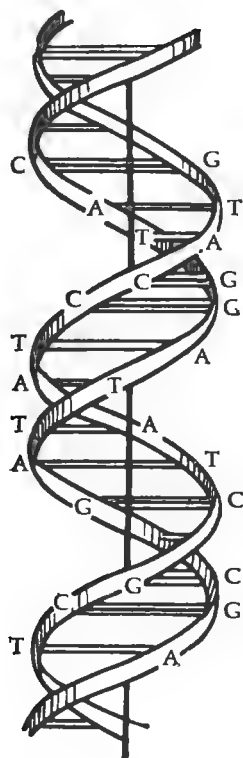


Рис. 7.3. Схематическое изображение двойной спирали ДНК. Две ленты изображают сахарофосфатную цепь, горизонтальные линии — связывание пар оснований, а вертикаль — ось спирали.



Направление цепей в отношении межнуклеотидных связей неодинаково, т. е. цепи *антипараллельны*. Если, например, в верхней цепи фосфодиэфирные связи между А и Г, Г и Т, Т и С и т. д. принадлежат к типу $5' \rightarrow 3'$, то в нижней цепи фосфодиэфирные связи между Т и С, С и А, А и Г и т. д. принадлежат к типу $3' \rightarrow 5'$. Обе цепи являются правовращающимися спиралями, закрученными вокруг одной и той же оси. Модель, иллюстрирующая образование спирали из двух цепей, показана на рис. 7.3.

7.2.5. Синтетические полинуклеотиды

Известны полинуклеотиды, содержащие один или два вида нуклеиновых оснований. Они синтезируются энзиматически с помощью полинуклеотидфосфорилазы и РНК-полимеразы (гл. 26) в случае полирибонуклеотидов и с помощью ДНК-полимеразы I (гл. 25) в случае полидезоксирибонуклеотидов.

Когда полиадениловая кислота [poly(A)] смешивается с полиуридиловой кислотой [poly(U)], образуется аналогичная ДНК

двуспиральная структура с водородными связями между парами А и У. При определенных условиях могут образоваться и тройные спирали, состоящие из одной нити poly(A) и двух нитей poly(U) . Дву- и трехспиральные структуры получены также из полиинозиновой и полицитидиловой кислот.

Синтетический полидезоксирибонуклеотид polyd(A-T) имеет двуспиральную структуру, в которой каждая цепь обладает определенной чередующейся последовательностью оснований $\dots \text{dA} \cdot \text{dT} \cdot \text{dA} \cdot \text{dT} \dots$. Методом дифракции рентгеновских лучей установлено, что литиевая соль этого полинуклеотида существует в В-форме с размерами спирали, идентичными размерам спирали литиевой соли ДНК. Как и ожидалось, ДНК, построенная только из остатков адениловой и тимидиновой кислот, имеет очень низкую температуру плавления $T_{\text{пл}}$ (см. ниже). Аналогичный сополимер polyd(I-C) с чередующимися основаниями имеет размеры спирали и физические свойства, подобные polyd(A-T) .

Простые полимеры с регулярной структурой, подобные описанным выше, найдены в центромерных областях хромосом эукариот (гл. 25). Их выделяли с помощью равновесного центрифугирования ДНК (из тканей животных) в градиенте плотности хлорида цезия; они обнаруживаются в виде *сателлитной* полосы низкой плотности. Один из сателлитов, присутствующих в ДНК некоторых видов крабов, по составу и последовательности аналогичен polyd(A-T) -сополимеру с чередующимися основаниями. Он состоит приблизительно на 97% из последовательно чередующихся дезоксиадениловой и тимидиловой кислот; гуаниловые и цитидиловые остатки (на которые приходится 3%) распределены по всей молекуле сателлитной ДНК. Аналогичные ДНК выделены из тканей многих животных.

7.2.6. Изменения в последовательности оснований.

Мутации

Изменения в последовательности оснований ДНК называются *мутациями* и могут включать *замещение*, *делецию* или *вставку* одного или более оснований. Известны также *инверсии* или *транслокации* последовательности оснований. Среди различных видов мутаций наиболее распространено замещение одной пары оснований. Замещение может быть следствием ошибок в спаривании оснований в процессе синтеза ДНК (гл. 25). Такие ошибки спаривания могут быть вызваны изменением структуры основания, например таутомерным сдвигом от кето- к енольной форме в момент спаривания. Измененное основание может присутствовать либо в матрице ДНК, либо в поступающем для синтеза дезоксирибонуклеотиде. Замещение имеет место, например, вследствие способности редкой лактимной формы тимина давать пару с нормальной лактам-

ной формой гуанина, что превращает пару гуанин — цитозин в пару аденин — тимин.

Некоторые аналоги оснований, например 5-бромурацил, также могут увеличивать частоту замещений, поскольку относительная доля лактимной формы увеличивается, и поэтому увеличивается степень ошибочного спаривания.

7.2.7. Плотность ДНК

Если концентрированные растворы хлорида цезия центрифугировать в аналитической ультрацентрифуге при высоких скоростях до установления равновесия между седиментацией и диффузией (гл. 5), создается стабильный градиент концентрации CsCl. Это соответствует увеличению плотности раствора в направлении центробежной силы. Формируемый градиент плотности пропорционален центробежной силе в соответствии с уравнением $dp/dr = \alpha \omega^2 r$, где ρ — плотность, являющаяся функцией от радиуса r (расстояние от центра вращения), ω — угловая скорость и α — константа, зависящая от природы соли. Если раствор CsCl содержит небольшое количество ДНК, то в условиях равновесия молекулы ДНК собираются в полосы в тех зонах ячейки для центрифугирования, где их плотность и плотность среды равны (изопикничны). Положение ДНК в ячейке может быть установлено по поглощению в ультрафиолетовой области, регистрируемому с помощью фотографии. Точно вычислив градиент плотности раствора вдоль ячейки, можно найти плотность образца ДНК. Эта техника называется *изопикническим центрифугированием в градиенте плотности*. Плавающая плотность ДНК находится в эмпирической зависимости от содержания G+C в молекуле:

$$\rho \text{ (г/см}^3\text{)} = 1,660 + 0,100 \text{ (содержание G+C)}$$

Это свойство позволяет фракционировать молекулы ДНК по содержанию в них G+C.

7.2.8. Денатурация ДНК

Кроме водородных связей поддержанию жесткой двуспиральной структуры способствуют гидрофобные силы между расположенными «стопкой» пуринами и пиримидинами. Реагенты, подобные формамиду и мочеvine, которые увеличивают сольватацию ароматических ядер молекулами воды, вызывают также денатурацию ДНК. По аналогии с действием целого ряда реагентов и условий, например кислоты, щелочи, нагревания и низкой ионной силы, изменение структуры ДНК в этом случае можно объяснить тем, что первоначально прочная двуспиральная структура ДНК переходит в денатурированное состояние, для которого характерна гибкая одно-

цепочечная структура. Для оценки перехода от нативного состояния к денатурированному, как и для определения других свойств ДНК, существует ряд методов.

7.2.8.1. Поглощение в УФ-области

Все нуклеиновые кислоты сильно поглощают свет в УФ-области с максимумом ~ 260 нм. Когда нативность ДНК нарушается, наблюдается заметный *гиперхромный эффект* — увеличение поглощения. Это изменение отражает уменьшение числа водородных связей и отмечается не только для ДНК, но и для РНК и синтетических полинуклеотидов, которые имеют стабилизируемую водородными связями структуру.

7.2.8.2. Оптическое вращение

Нативная ДНК обладает сильным положительным вращением плоскости поляризации света, которое заметно уменьшается при денатурации.

7.2.8.3. Вязкость

Растворы нативной ДНК имеют высокую вязкость, что является следствием наличия относительно жесткой двуспиральной и вытянутой стержнеподобной структуры ДНК. Разрушение водородных связей приводит к заметному уменьшению вязкости.

7.2.8.4. Влияние температуры

Как отмечалось выше, нагревание образца ДНК в определенной ионной среде вызывает увеличение поглощения в УФ-области и снижение оптического вращения и вязкости, отражая разрушение водородных связей между нитями двойной спирали.

Поскольку взаимодействия между основаниями двух цепей кооперативны, подобно взаимодействиям между молекулами в кристалле, упорядоченная спиральная структура разрушается в пределах небольшого температурного интервала, как это происходит при плавлении кристалла. По этой причине денатурацию двухцепочечной ДНК при нагревании часто называют «плавлением» ДНК, а температуру, при которой денатурировано 50% ДНК, — температурой плавления $T_{пл}$.

Препараты ДНК из разных источников имеют различные $T_{пл}$, которые зависят от абсолютных количеств G+C и A+T (рис. 7.4). Чем выше содержание G+C, тем выше температура перехода между нативной двойной спиралью и одноцепочечной формой (рис.

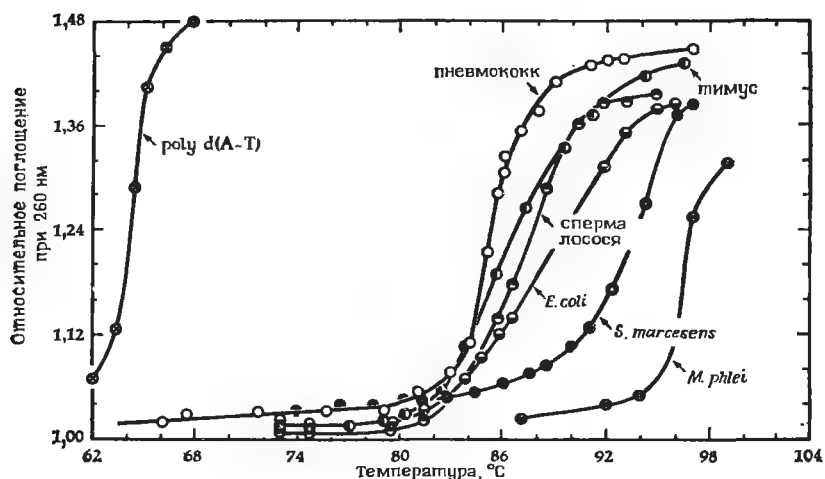


Рис. 7.4. Кривые плавления образцов ДНК разного состава. [Doty P., p. 8, in D. J. Bell, J. K. Grant (eds.), The Structure and Biosynthesis of Macromolecules, Biochemical Society Symposia, № 21, Cambridge University Press, New York, 1962.]

7.5). Это понятно, так как пары G—C могут образовывать структуру с помощью трех водородных связей, в то время как пары A—T могут образовать только две водородные связи* (рис. 7.2). Определение значений $T_{пл}$ при использовании для калибровки препаратов ДНК с известным составом позволяет вычислить содержание G+C и A+T неизвестной ДНК. Такое определение следует проводить при фиксированной ионной силе и pH, так как эти факторы существенно влияют на стабильность ДНК. Значение $T_{пл}$ можно снизить, добавляя мочевину — реагент, разрушающий водородные связи и препятствующий гидрофобным взаимодействиям. Например, в 8 М мочеvine $T_{пл}$ снижается до $\sim 20^\circ\text{C}$. В 95%-ном формамиде ДНК полностью разделяется на две нити при комнатной температуре.

7.2.8.5. Влияние pH

Двуспиральная структура ДНК разрушается также при кислых и щелочных значениях pH, при которых на пуриновых и пиримидиновых основаниях могут появляться заряженные группировки. Вблизи pH 12 ионизация енольных гидроксидных групп предотвра-

* Число водородных связей не определяет прочности пары. Так, 2-аминоаденин даст комплекс с тиминном с тремя водородными связями, который по прочности сравним скорее с парой A—T, чем G—C. — Прим. перев.

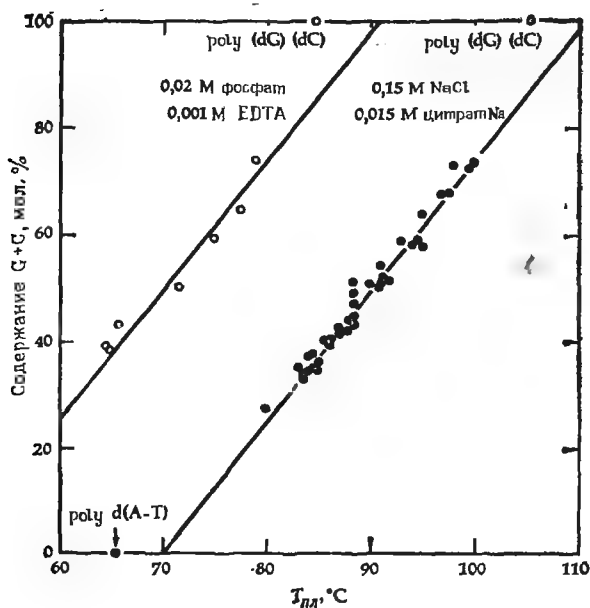


Рис. 7.5. Зависимость $T_{пл}$ от содержания G+C. Точки соответствуют образцам ДНК из различных источников. [Doty P., p. 8, in: D. J. Bell, J. K. Grant (eds.), *The Structure and Biosynthesis of Macromolecules*, Biochemical Society Symposia, № 21, Cambridge University Press, New York, 1962.]

щает связывание кето- и аминогрупп за счет водородных связей. Аналогично в кислых растворах вблизи pH 2—3, при которых протонируются аминогруппы, спираль разрушается.

7.2.9. Ренатурация ДНК

Денатурация ДНК — процесс обратимый. Если ДНК только частично денатурирована, например при нагревании, то при снижении температуры происходит быстрая ренатурация каждой молекулы ДНК, скорость которой соответствует реакции первого порядка. Если ДНК полностью денатурирована, две комплементарные нити будут реассоциировать медленно («отжиг» ДНК). Этот процесс включает две стадии: сначала по реакции второго порядка происходит сборка комплементарных последовательностей двух нитей, а затем по реакции первого порядка — быстрое их «защелкивание». Если начальная концентрация денатурированной ДНК C_0 (молярная концентрация фосфата ДНК), то изменение концентрации C одноцепочечной ДНК во времени подчиняется уравнению реакции второго порядка $dc/dt = K_2 C^2$, интегральная форма кото-

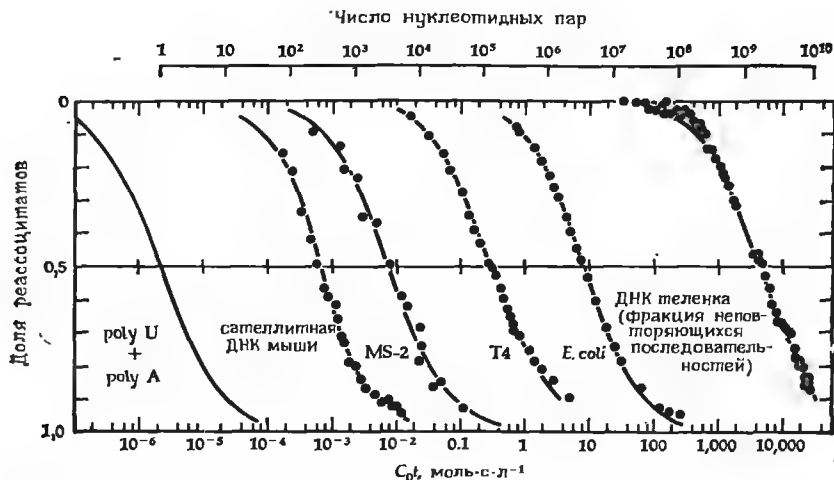


Рис. 7.6. Ренатурация двухцепочечных нуклеиновых кислот из различных источников. [Britten R. J., Kohne D. E., Science, 161, 529, 1968.]

рого $C/C_0 = 1/(1 + K_2 C_0 t)$. Скорость ренатурации обычно оценивается по графику зависимости C/C_0 от $\lg C_0 t$ (рис. 7.6). Построив график, можно найти $C_0 t_{1/2}$, где $t_{1/2}$ — время, при котором $C/C_0 = 0,5$, а также константу скорости реакции второго порядка K_2 , равную $\frac{1}{C_0 t_{1/2}}$. Константа K_2 — характеристический параметр для данной ДНК; она обратно пропорциональна N — числу пар оснований ДНК (если ДНК не имеет повторяющихся последовательностей). $C_0 t_{1/2}$ прямо пропорционально N (N называется *сложностью* ДНК). Этот метод позволяет определить для бактериальных и вирусных ДНК значения N , согласующиеся со значениями, полученными другими методами.

7.2.10. Размер ДНК

Молекулы ДНК длинные и неразветвленные. Их размер можно охарактеризовать тремя параметрами — длиной, числом нуклеотидных пар и массой. Так, ДНК длиной 1 мкм (10⁻⁴ см) содержит 3000 пар оснований и имеет массу 2·10⁶ дальтон (660 дальтон на 1 пару оснований для Na⁺-соли). Первоначально предполагалось, что ДНК должна быть не длиннее, чем 15 000 пар оснований (5·10⁻⁴ см), пока не было найдено, что она легко рвется под действием гидродинамических сил. При осторожной работе, исключающей гидродинамический разрыв, можно выделить значительно более длинные молекулы ДНК (табл. 7.4).

Таблица 7.4
Размер различных молекул ДНК

Организм	Среднее число пар оснований на хромосому, $\times 10^{-3}$	Длина, см	Число хромосом (гаплоидный набор)	Форма
Вирус 40 (SV40) обезьяны	5,1	0,00017	1	Кольцевая
Бактериофаг ϕ X174	5,4	0,00018	1	Кольцевая одно-цепочечная; двойная репликативная
Бактериофаг λ	46	0,0015	1	Линейная
<i>E. coli</i>	4 000	0,13	1	Кольцевая
Дрожжи	1 000	0,33	17	
<i>Drosophila melanogaster</i>	41 000	1,4	4	
Человек	125 000	4,1	23	

Длину молекул ДНК, содержащих от $3 \cdot 10^2$ до $3 \cdot 10^5$ нуклеотидных пар, можно измерить непосредственно с помощью электронного микроскопа. Молекулы ДНК с размерами нуклеотидных пар от $2 \cdot 10^2$ до $2 \cdot 10^4$ можно разделить на пористых гелях агарозы, используя молекулярно-ситовый эффект.

Классическим методом определения размеров ДНК является седиментация в центробежном поле. Скорость седиментации молекул пропорциональна силе поля $\omega^2 r$ и определяется уравнением $dr/dt = s\omega^2 r$, где ω — угловая скорость и r — расстояние до центра вращения. Коэффициент седиментации s связан с молекулярной массой ДНК эмпирическим уравнением $s = 0,0882 \cdot 10^{-13} M^{0,346}$. Определение размера ДНК с помощью центрифугирования ограничено областью от $3 \cdot 10^2$ до $1,5 \cdot 10^6$ пар оснований из-за гидродинамических разрывов более длинных молекул.

Для определения с помощью седиментации размера молекул ДНК, содержащих более 10^8 нуклеотидных пар, используют новую технику вязкоэластичного замедления. В этом случае в раствор ДНК, размер молекул которой измеряют, погружают ротор и очень медленно поворачивают его с помощью внешнего магнитного поля. Когда магнитное поле выключается, ротор возвращается в первоначальное положение за счет энергии, накопленной в эластично растянутых молекулах ДНК. Скорость, с которой ротор возвращается в первоначальное положение, является функцией молекулярной массы самых больших молекул ДНК в растворе и связана с ней уравнением $M = 2,2 \cdot 10^8 \tau^{0,6}$, где τ — время вязкоэластичного замедления (в секундах). τ находят по уравнению $\theta(t) - \theta(\infty) =$

$=\theta(0)e^{-t/\tau}$, где θ — угол поворота ротора, измеренный в момент времени t , ∞ и 0.

Найдено, что длина ДНК в самой большой хромосоме *Drosophila melanogaster*, измеренная этим методом, находится в хорошем соответствии с массой ДНК, определенной цитологическими методами. Из этих измерений следует важный вывод, что хромосомы животных, подобно бактериальным и вирусным хромосомам, содержат по одной непрерывной ДНК-спирали. Длина молекулы ДНК в самой большой хромосоме человека может достигать 8 см и более.

7.2.11. Топология ДНК

Изолированные молекулы ДНК могут быть линейными, т. е. содержать два конца, или циклическими (табл. 7.4). Однако ДНК обычно существует не в вытянутой форме, а плотно упакована в хромосоме клетки или в головке вируса. Хотя длина ДНК самой большой хромосомы человека может составлять 8 см, она так упакована в хромосоме, находящейся в состоянии митоза, что ее длина составляет всего 5 нм.

Если обе нити циклической двуспиральной ДНК, например ДНК вируса SV40 или репликативной формы ДНК фага ϕ X174, замкнуты, т. е. сахарофосфатная цепь непрерывна, то они могут иметь суперспиральную или суперскрученную конформацию.

Суперспирализация имеет место, когда в правовращающей спирали ДНК число пар оснований на единицу длины больше стандартного и, как следствие, образуются отрицательные супервитки (рис. 7.7). Суперспирализация может быть нарушена расщеплением одной или двух нитей, например действием дезоксирибонукле-

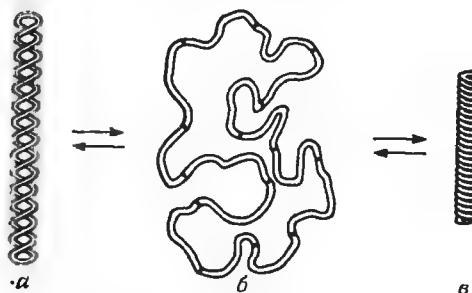
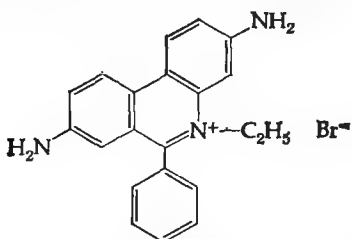


Рис. 7.7. Схематическое изображение эффектов связывания этидийбромида с ДНК вируса SV40. а — молекула ДНК (без красителя) с 14 отрицательными супервитками; б — при связывании 420 молекул красителя супервитки полностью исчезают; в — при дальнейшем связывании 720 молекул красителя молекулы ДНК переходят в состояние с 24 положительными супервитками. [Bauer W., Vinograd J., J. Mol. Biol., 33, 141, 1968.]

азы. Вторым методом является интеркаляция плоских молекул, таких, как *этидийбромид*, между стопками пар оснований.



Этидийбромид

Интеркаляция одной молекулы этидийбромида раскручивает суперспираль на 12° , так что требуется 30 молекул этидийбромида на один суперспиральный виток. Когда отрицательные суперспиральные витки полностью раскручены, дальнейшее добавление этидийбромида вызывает появление новых витков суперспирали, но теперь в положительном направлении (рис. 7.7).

7.2.12. Белки, связанные с ДНК

У *прокариот* (бактерий и сине-зеленых водорослей) ДНК связана с незначительным количеством белка. На каждый межнуклеотидный фосфат ДНК, так же как и РНК, приходится одна анионная группа с $pK'_a \approx 1$. Следовательно, нуклеиновые кислоты при нейтральных pH существуют в виде солей Na^+ , Mg^{2+} или других катионов. В некоторых бактериофагах и растительных вирусах нуклеиновые кислоты связаны с ди- и полиаминами, такими, как кадаверин, путресцин, спермин и спермидин (гл. 22).

У *эукариот* ДНК находится в таких цитоплазматических оргanelлах, как митохондрии (гл. 12), хлоропласты (гл. 16), а также в хромосомах ядер. Ядерная ДНК клеток растений и животных соединена с основными белками — гистонами, которые связаны с ДНК не ковалентно, а с помощью ионных и, возможно, иных дополнительных взаимодействий. В хромосомах присутствует также небольшие количества кислых белков.

Комплекс ДНК с гистонами, называемый *хроматином*, может быть выделен из интерфазного ядра. Этот комплекс содержит ДНК и гистоны в приблизительно равных количествах.

7.2.12.1. Гистоны

Эти белки обычно получают экстракцией ядер или хроматина разбавленными кислотами (0,2 M HCl). Они осаждаются из раствора щелочами при $pH \sim 10$ или путем высаливания. Разделение

гистонов на индивидуальные достигается гель-фильтрацией, ионо-обменной хроматографией или электрофорезом. Существует пять основных классов гистонов, некоторые из которых подразделяются на подклассы. Одни и те же классы гистонов были найдены во всех изученных клетках животных и растений. Все гистоны — относительно небольшие белки с молекулярной массой от 12 000 до 20 000, содержащие ~25% остатков аргинина и лизина; они не содержат триптофана и, за исключением одного белка, цистеина и цистина. Классификация гистонов основана на относительных количествах лизина и аргинина. Гистон H1 очень богат лизином. В то же время для гистона H2 характерно умеренное содержание этой аминокислоты, причем существуют два типа этого гистона — H2A и H2B. Гистон H3 умеренно богат аргинином и содержит цистеин. Гистон H4 богат аргинином и глицином (табл. 7.5).

Гистоны одного и того же типа, полученные из различных животных и растений, имеют очень сходные аминокислотные последовательности. Такой консерватизм в эволюции, по-видимому, отражает необходимость сохранения последовательности, обеспечивающей существенные и специфические функции. Это лучше всего подтверждается тем фактом, что аминокислотные последовательно-

Таблица 7.5

Аминокислотный состав гистонов тимуса теленка^a

Тип гистона	Гистон	Аминокислотный состав, %				Общее число аминокислот	Относительное содержание аминокислот, % от общего числа			Молекулярная масса
		Lys	Arg	Ala	Gly		основных	кислых	гидрофобных	
Богатый лизином	H1	27	2	24		215	31	5	10	~21 000
Умеренно богатый лизином	H2B	16	6			125	24	13	17	13 774
Богатый аргинином и лизином	H2A	11	9		11	129	23	14	24	15 246
Богатый аргинином	H3	10	15 ^b			135	24	15	18	15 342
Богатый глицином и аргинином	H4	10	14		15	102	27	11	23	11 282

^a Данные из работ различных авторов; обобщены в работе: *Lewin B., Gene Expression-2, Eukaryotic Chromosomes*, p. 106, John Wiley & Sons, New York, 1974.

^b Плюс два цистеина.

сти гистона Н4 из проростков гороха и тимуса быка отличаются только двумя из 102 остатков, присутствующих в молекуле. В гистоне Н4 NH_2 -концевая область содержит большинство основных остатков, в то время как COOH -концевая область молекулы содержит большую часть гидрофобных остатков и лишь незначительное число основных аминокислот. Такое необычное распределение аминокислот проявляется также в известных последовательностях гистонов Н2А, Н2В и Н3. Напротив, в молекуле гистона Н1 COOH -концевая область содержит больше основных остатков и богата пролином, а в NH_2 -концевой — больше кислых и гидрофобных остатков.

В состав гистонов входят модифицированные аминокислотные остатки, например О-фосфосерин, моно-, ди- и три- ϵ -N-метиллизин, ϵ -N-ацетиллизин и различные метилированные производные аргинина. Возможная роль гистонов и значение модифицированных остатков обсуждаются ниже (гл. 25).

Кроме взаимодействия с ДНК гистоны также взаимодействуют друг с другом. Экстракцией 2 М NaCl (а не кислотой) из хроматина выделен тетрамер, состоящий из двух молекул гистона Н3 и двух молекул гистона Н4. В этих же условиях гистоны Н2А и Н2В могут быть выделены вместе в виде димера. Современная модель структуры хроматина предполагает, что один тетрамер и два димера взаимодействуют с 200 парами оснований ДНК, что составляет участок длиной ~ 70 нм. При этом образуется сферическая структура диаметром 11 нм. Считается, что хроматин представляет собой подвижную цепь, составленную из таких единиц. Эта предположительная модель подтверждается данными электронной микроскопии и методом дифракции рентгеновских лучей, а также расщеплением хроматина дезоксирибонуклеазой как в выделенных ядрах, так и в очищенных нитях хроматина (гл. 25).

7.2.12.2. Протамины

Протамины встречаются в зрелой сперме некоторых видов рыб после завершения деления клеток, когда эти основные белки замещают гистоны. Протамины — относительно небольшие белки, не содержащие многих аминокислот, но чрезвычайно богатые аргинином. Протамины не получены из ядер соматических клеток.

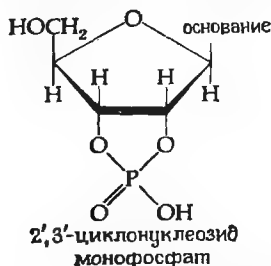
7.3. Структура рибонуклеиновых кислот

Существуют три вида РНК, различающиеся составом, размером, функциональными свойствами и локализацией в клетке. Ниже сначала представлены некоторые общие данные, касающиеся структуры РНК, затем вкратце обсуждены свойства различных видов РНК; специальные функции изложены в гл. 26.

7.3.1. Межнуклеотидная связь

В РНК возможна этерификация гидроксидных групп при атомах С-2', С-3' и С-5'. При обработке РНК фосфодиэстеразой змеиного яда основными продуктами гидролиза являются нуклеозид-5'-фосфаты; при обработке РНК фосфодиэстеразой селезенки образуются нуклеозид-3'-фосфаты. Следовательно, как и в случае ДНК, межнуклеотидные связи в РНК находятся между атомами С-3' и С-5'.

В отличие от ДНК РНК гидролизуется слабыми щелочами (рН 9 при 100°C и рН 12 при 37°C). Эта обработка приводит к перемещению одной связи и образованию 2',3'-циклического фосфата, показанного ниже, для каждого пуринового и пиримидинового мононуклеотида, присутствующего в РНК.



Дальнейшее действие щелочи на циклические соединения вызывает произвольное гидролитическое расщепление, что приводит к смеси изомерных 2'- и 3'-мононуклеотидов.

Возможность образования циклических промежуточных продуктов существует только для РНК, так как ДНК не имеет гидроксидной группы при С-2'. Это объясняет относительную стабильность ДНК в слабых щелочах. Панкреатическая рибонуклеаза и рибонуклеаза Т1 (табл. 7.3) также образуют и гидролизуют циклические 2',3'-фосфаты, которые превращаются только в 3'-фосфаты. Структура и механизм действия панкреатической РНазы приводятся ниже (гл. 9). Различные типы циклических нуклеотидов, например аденозин-3',5'-циклофосфат, как доказано, играют важную роль в процессах метаболизма (часть третья).

7.3.2. Транспортная РНК

Транспортная РНК (тРНК) составляет ~10—20% клеточной РНК и объединяет сравнительно небольшие молекулы с молекулярной массой ~30 000. тРНК функционирует как «адаптор» в синтезе пептидной связи, причем по крайней мере одна специфическая тРНК служит для каждой аминокислоты. В настоящее время идентифицировано более 60 различных тРНК; роль тРНК рассматривается в гл. 26.

Щелочной гидролиз тРНК высвобождает нуклеозид N с 3'-конца, смесь 2'- и 3'-моонуклеотидов и рNp с 5'-конца. Каждая тРНК представляет собой цепь, включающую от 75 до 90 нуклеотидов.

Хотя тРНК состоит в основном из четырех рибонуклеотидов (адениловой, гуаниловой, цитидиловой и уридиловой кислот), в ней имеются незначительные количества других нуклеотидов. Они включают в себя нуклеотиды, содержащие псевдоуридин (см. ниже), различные метилированные аденины и гуанины, метилированные пиримидины (такие, как тимин и 5-метилцитозин) и др. Не все они встречаются в какой-либо одной молекуле тРНК, но псевдоуридин и дигидроуридин* являются наиболее распространенны-

Таблица 7.6

Некоторые нуклеозиды, найденные в транспортных РНК,
выделенных из различных источников

Название	Сокращение	Название	Сокращение
Аденозин	A	1-Метилгуанозин	m ¹ G
1-Метиладенозин	m ¹ A	N ² -Метилгуанозин	m ² G
2-Метиладенозин	m ² A	N ² N ² -Диметилгуанозин	m ² ₂ G
N ⁶ -Метиладенозин	m ⁶ A	7-Метилгуанозин	m ⁷ G
N ⁶ ,N ⁶ -Диметиладенозин	m ⁶ ₂ A	2'-О-Метилгуанозин	Gm
N ⁶ -Изопентениладенозин	i ⁶ A	Инозин	I
N ⁶ -Изопентенил-2-метил- тиоаденозин	m ² s ² i ⁶ A	1-Метилинозин	m ¹ I
N ⁶ -(N-Треонилкарбо- нил)аденозин	t ⁶ A	Псевдоуридин	ψ
2'-О-Метиладенозин	Am	2'-О-Метилпсевдоуридин	ψm
Цитидин	C	Риботимидин ^a	T
5-Метилцитидин	m ⁵ C	Уридин	U
N ⁴ -Метилцитидин	m ⁴ C	5,6-Дигидроуридин	hU или D
N ⁴ -Ацетилцитидин	ac ⁴ C	3-Метилурпидин	m ³ U
2'-О-Метилцитидин	Cm	2'-О-Метилуридин	Um
2-Теоцитидин	s ² C	2-Теоуридин ^b	s ² U или ² S
Гуанозин	G	4-Теоуридин	s ⁴ U или ⁴ S
		5-Карбоксиметилуридин	cm ⁵ U

^a Второе название 5-метилуридин.

^b 2-Теоуридины имеют в 5-положении заместителн — метил, метиламнометил и 5-карбоксиметильную группу.

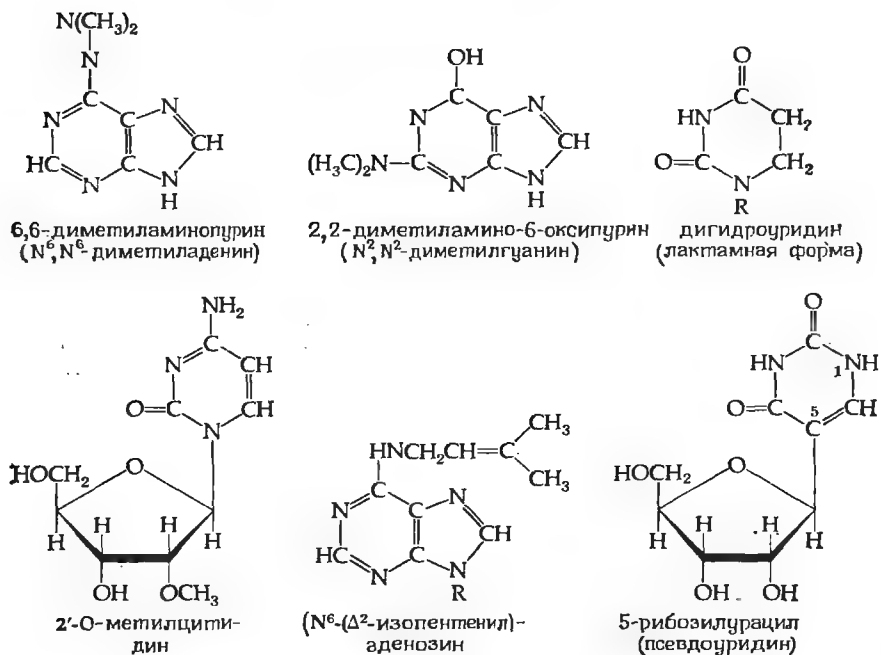


Рис. 7.8. Структурные формулы некоторых редких оснований и нуклеозидов тРНК. R — рибоза.

ми и универсальными. Список некоторых известных минорных компонентов тРНК и их сокращенные обозначения приведены в табл. 7.6. Структура некоторых из них показана на рис. 7.8.

Псевдоуридин представляет особый интерес, так как в нем отсутствует обычная N-гликозидная связь, C-1-атом рибозы связан с 5-положением урацила C—C-связью. В случае 2'-О-метилнуклеотидов нуклеотидные связи оказываются устойчивыми к гидролизу щелочью и ферментами. Возможная функциональная роль псевдоуридина и других необычных оснований обсуждается ниже (гл. 26).

Определена первичная структура более 50 тРНК, а в случае фенилаланин-специфичной тРНК известно также и пространственное строение (гл. 26).

Наиболее общий метод анализа первичной структуры тРНК заключается в следующем. Молекулы тРНК, меченные ³²P, гидролизуются до небольших фрагментов под действием панкреатической РНАзы, РНАзы Т1 или смеси этих ферментов. Радиоактивные фрагменты гидролиза, олигонуклеотиды, разделяются двумерным электрофорезом (гл. 5). В первом направлении проводят высоковольтный электрофорез на ацетате целлюлозы при pH 3,5. Затем продукты переносят на ДЭАЭ-целлюлозу и вновь проводят электрофорез при кислых зна-

- Bloomfield V. A., Crothers D. M., Tinoco I., Jr.*, Physical Chemistry of Nucleic Acids, Harper & Row, Publishers, Incorporated, New York, 1974.
- Cantor G. L., Davies D. R.*, eds., Procedures in Nucleic Acid Research, vol. 2, Harper & Row, Publishers, Incorporated, New York, 1971.
- Davidson J. N., Cohn W. E.*, eds., Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Academic Press, Inc., New York. (Серия книг, опубликованных в разное время, начиная с 1963 г.)
- Fitzsimons D. W., Wolstenholme G. E. W.*, eds., The Structure and Function of Chromatin, Ciba Found. Sym., 28, Elsevier, Excerpta Medica, North Holland Associated Scientific Publishers, Amsterdam, 1975.
- Hall R. H.*, The Modified Nucleosides in Nucleic Acids, Columbia University Press, New York, 1971.
- Kornberg A.*, DNA Synthesis, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1974.
- T'so P. O. P.*, Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry, Academic Press, Inc., New York, 1974.

Обзорные статьи

- DeLange R. J., Smith E. L.*, Histones: Structure and Function, Annu. Rev. Biochem., 40, 279—314, 1971.
- DeLange R. J., Smith E. L.*, Chromosomal Proteins, in: H. Neurath, R. L. Hill, eds., The Proteins, Academic Press, Inc., New York, 1977.
- Elgin S. C. R., Weintraub H.*, Chromosomal Proteins and Chromatin Structure, Annu. Rev. Biochem., 44, 725—774, 1975.
- Felsenfeld G., Miles H. T.*, The Physical and Chemical Properties of Nucleic Acids, Annu. Rev. Biochem., 36, 407—448, 1967.
- Gilham P. T.*, RNA Sequence Analysis, Annu. Rev. Biochem., 39, 227—250, 1970.
- Maxam A., Gilbert W.*, A New Method for Sequencing DNA, Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 560—564, 1977.
- Roberts T. M., Lauer G. D., Klotz L. C.*, Physical Studies on DNA, from Primitive Eukaryotes, Crit. Rev. Biochem., 3, 349—449, 1976.
- Wu R., Bambara R., Jay E.*, Recent Advances in DNA Sequence Analysis, Crit. Rev. Biochem., 2, 455—512, 1974.
- Various authors, pp. 205—336 in: P. D. Boyer, ed., The Enzymes, vol. IV, 3d ed., Academic Press, Inc., New York, 1971.
- Номенклатуру см.: IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Abbreviations and Symbols for Nucleic Acids, Polynucleotides and Their Components, J. Biol. Chem., 245, 5171. 1970.

ЧАСТЬ ВТОРАЯ

КАТАЛИЗ

Глава 8

ФЕРМЕНТЫ. I

Природа. Классификация.

Кинетика. Ингибиторы метаболизма.

Регуляция ферментативной активности

Биохимические реакции протекают с большой скоростью благодаря участию природных катализаторов, называемых *ферментами*. Высокая степень специфичности и высокая эффективность ферментов обеспечивают строго определенные последовательности превращения метаболитов. Ферменты функционируют во всех живых организмах, и осуществление общих для всех клеток метаболических превращений является следствием специфичности соответствующих ферментов.

Ферментативные процессы использовались человеком еще в глубокой древности. Открытие брожения как способа получения вина греки приписывали богу Бахусу. Энзиматические процессы, лежащие в основе изготовления сыра и хлеба и получения уксуса, также известны с античных времен. Сложившиеся в результате практической деятельности представления занимают важное место в истории энзимологии. Полученная на пивоваренных заводах и в их лабораториях информация о процессах утилизации сахара имела весьма важное общее значение, поскольку основные реакции, происходящие при брожении в культуре дрожжей и при превращении сахара в тканях млекопитающих, по существу идентичны. Интересно отметить, что слово «энзим», предложенное Кюне, обозначает «в дрожжах», однако в настоящее время это слово используется как термин для обозначения биологического катализатора независимо от его происхождения (см. гл. 1).

Одним из наиболее важных достижений биохимии девятнадцатого столетия является выяснение того обстоятельства, что протекание спиртового и других типов брожения вызывается живыми клетками. Берцелиус, один из первых исследователей, охарактеризовавших природу каталитических процессов, предположил в 1837 г., что ферменты — катализаторы, поставляемые живыми клетками. Работы Пастера и ряда других исследователей опровергли существовавшее ранее представление о том, что при брожении и гниении могут спонтанно зарождаться живые организмы, и установили, что эти процессы вызываются микроор-

гаизмами. Пастер, однако, пришел к заключению, что эти процессы осуществляются только интактными живыми клетками.

Энзимология получила хороший стимул для развития в 1897 г., когда братья Бухнеры показали, что дрожжевой бесклеточный сок способен сбраживать сахар с образованием спирта и CO_2 . Тогда стало очевидным, что дрожжевой сок содержит сложную смесь ферментов, требуемых для осуществления брожения, и что ферменты могут функционировать как внутри, так и вне клеток. До начала нашего столетия было очень мало сведений относительно химической природы ферментов; затем стало появляться все большее число данных, свидетельствующих о том, что ферменты, по-видимому, являются по своей природе белками. Сообщение Самнера в 1926 г. о выделении фермента уреазы в виде кристаллического белка было встречено с некоторым скептицизмом, однако в течение нескольких последующих лет Нортроп и Кунитц выделили в кристаллическом виде пепсин, трипсин и химотрипсин. С этого времени получены сотни ферментов в высокоочищенном состоянии, а многие — в кристаллическом виде; для всех выделенных ферментов была доказана белковая природа.

До 1926 г. основное внимание при изучении ферментов уделялось характеру катализируемых ими химических реакций. После того как ферменты стали доступны в высокоочищенном и кристаллическом состоянии, их начали исследовать методами химии белка. По существу основные сведения по химии белков и о процессах метаболизма получены в ходе исследований по структуре и механизму действия ферментов.

В настоящее время значительная часть исследований, связанных с живыми клетками, посвящена ферментам, поскольку различные физиологические функции, например мышечное сокращение, нервная проводимость, почечная секреция и жизнь клетки в целом, неразрывно связаны с активностью ферментов. Такой сложный процесс, как мышечное сокращение, требующий обеспечения энергией, представляет собой, по существу, последовательность катализируемых ферментами реакций. Многие из этих реакций успешно исследуются *in vitro* (в виде изолированных систем), поскольку соответствующие ферменты выделены в кристаллическом состоянии.

В условиях организма даже относительно простые реакции могут катализироваться ферментами, если некатализируемые реакции являются слишком медленными для обеспечения физиологических потребностей. Примером может служить обратимое взаимодействие CO_2 и H_2O с образованием H_2CO_3 : в крови эта реакция катализируется ферментом *карбоангидразой*. В отсутствие катализатора обмен CO_2 между кровью и тканями, а также между кровью и легкими не может осуществляться со скоростями, обеспечивающими физиологические потребности.

8.1. Природа ферментов

Прежде чем перейти к рассмотрению механизма действия ферментов, целесообразно ознакомиться с их общими свойствами.

8.1.1. Все ферменты — белки

Данных о каких-либо биокатализаторах, не являющихся белками, не имеется. Химические реакции, очевидно, могут ускоряться и небелковыми катализаторами; при этом некоторые из них увеличивают скорость реакций почти в такой же степени, как и ферменты, однако в живых организмах небелковые катализаторы не обнаружены. Ферменты значительно различаются по размеру молекул; известно, что некоторые из них имеют весьма небольшую молекулярную массу (10^4). Обычно, однако, они имеют более значительные размеры и их молекулярные массы находятся в пределах от $1,5 \cdot 10^4$ до 10^6 . Подобно всем белкам, они лабильны и после денатурации оказываются неактивными.

8.1.2. Ферменты увеличивают скорость химической реакции, но не расходуются в результате процесса

Эффективность ферментов чрезвычайно высока; одна молекула фермента может катализировать превращение 10^2 — 10^6 молекул субстрата в 1 мин. Для химической реакции $A + B \rightleftharpoons C + D$ скорость в прямом направлении пропорциональна концентрациям A и B:

$$v_1 = k_1 [A] [B]$$

а обратном — концентрациям C и D:

$$v_2 = k_2 [C] [D]$$

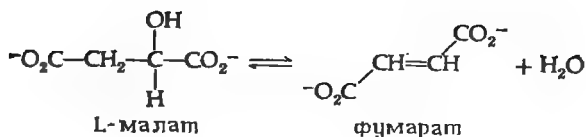
где k_1 и k_2 — константы скорости прямой и обратной реакций. При равновесии $v_1 = v_2$, следовательно,

$$k_1 [A] [B] = k_2 [C] [D] \text{ или } \frac{k_1}{k_2} = \frac{[C] [D]}{[A] [B]} = K_p$$

Таким образом, константа равновесия K_p представляет собой отношение констант скоростей прямой и обратной реакций. При данной температуре K_p постоянна для реакции в присутствии или в отсутствие фермента. Однако фермент сильно влияет на скорость превращения A и B в C и D и на скорость обратной реакции, так что достижение состояния равновесия в присутствии фермента происходит значительно быстрее, чем в его отсутствие.

8.1.3. Ферменты высокоспецифичны в отношении своих субстратов

Некоторые ферменты катализуют превращения только одного субстрата. Так, *фумараза* катализует взаимопревращение фумарата и малата:



Ни маленнат, являющийся *цис*-стереоизомером фумарата, ни *д*-малат не являются субстратами фумаразы. Другие ферменты имеют несколько более широкую субстратную специфичность. Так, например, все протеолитические ферменты, приведенные в табл. 6.3, гидролизуют пептидные связи, однако каждый из них специфичен к аминокислотам с определенными боковыми группами R. Эти ферменты, подобно фумаразе, проявляют высокую стереоспецифичность и катализируют гидролиз пептидных связей, образованных только *л*-(но не *д*-) аминокислотами. Ферменты специфичны также в отношении типа катализируемой реакции; так, фумараза катализирует гидратацию или дегидратацию своих субстратов, протеолитические ферменты — гидролитическую реакцию; при этом рассматриваемые ферменты не катализируют другие возможные превращения своих субстратов, например окислительно-восстановительные реакции или реакции декарбоксилирования. Однако о более широкой специфичности свидетельствует, например, способность многих протеолитических ферментов выступать в роли катализаторов гидролиза не только пептидов, но и эфиров и тиоэфиров.

При ферментативных реакциях (в отличие от неферментативных, осуществляемых химиками-органиками) наблюдаются лишь незначительные побочные процессы. Этот аспект эффективности и специфичности ферментов является особенно примечательным, поскольку они функционируют в водной среде, при атмосферном давлении, обычно при температуре около 37 °С и в среде с рН от 2 до 10, т. е. в условиях, при которых химику-органику редко удастся осуществить подобные по сложности реакции.

8.1.4. В ходе ферментативного катализа происходит образование промежуточного соединения (комплекса) фермента с его субстратом (или субстратами)

Однозначные данные об образовании в ходе ферментативных реакций фермент-субстратных комплексов явились крупным достижением биохимии. Предположение об образовании таких комплексов высказывалось многими исследователями, однако наиболее четкий и убедительный вывод был сделан в 1890 г. Эмилем Фишером. Результаты его экспериментов с *гликозидазами* показывали, что эти ферменты являются высокостереоспецифичными в отно-

шении своих субстратов. Он предположил, что специфичность обусловлена структурой самих ферментов, поскольку полученные результаты могли быть объяснены только при условии взаимодействия фермента и субстрата.

Широко известно следующее высказывание Э. Фишера: «Поскольку ферменты, по всей вероятности, являются белками... по-видимому, их молекулы также имеют асимметричную структуру; при этом асимметрия фермента в целом соответствует таковой у тексоэ. Только в том случае, если фермент и атакуемый им субстрат имеют сходную геометрическую форму, обе молекулы могут подойти друг к другу столь близко, чтобы могла произойти химическая реакция. Образно говоря, фермент и глюкоза должны соответствовать друг другу как замок и ключ». Результаты всех последующих исследований согласовывались с представлением об образовании промежуточных фермент-субстратных комплексов при ферментативном катализе. Такие исследования включали кинетический анализ, химическую модификацию боковых R-групп аминокислотных остатков фермента специфическими реагентами, ингибирование ферментов специфическими соединениями (которые взаимодействуют с активными центрами), определение характерных спектральных полос поглощения при действии ферментов на их субстраты и кристаллографическое исследование комплексов ферментов с соединениями, сходными по структуре с соответствующими субстратами.

8.1.5. Зона фермента, которая специфически взаимодействует с субстратом, называется активным центром

Конформация фермента такова, что определенные R-группы полипептидной цепи располагаются весьма специфическим образом, формируя активный центр. Пространственная структура активного центра предопределяет не только строение соединения, которое стереохимически комплементарно этому центру, но и природе последующих превращений, приводящих к образованию соответствующего продукта. Связывание субстрата с активным центром осуществляется в результате образования специфических нековалентных связей, включающих гидрофобные и электростатические взаимодействия, а также водородные связи. При контакте с активным центром субстрат оказывается в непосредственной близости от специфических групп фермента, кооперативное действие которых дестабилизирует определенные связи субстрата, превращая его в более реакционноспособное химическое соединение. Во многих случаях имеет место временное образование ковалентной связи между субстратом и ферментом.

8.1.6. Ферменты понижают энергию активации химической реакции

Распределение кинетической энергии среди популяции молекул при постоянной температуре представлено на рис. 8.1, а. При температуре T_1 энергия популяции молекул оказывается недостаточной для протекания специфической химической реакции; если, однако, температура повышается до T_2 , распределение энергии меняется, как показано на рисунке, и число столкновений между молекулами увеличивается, так что химическая реакция становится осуществимой. Таким образом, увеличение скорости реакции при повышении температуры от T_1 до T_2 является в основном результатом увеличения числа *активированных молекул*, т. е. доли молекул, обладающих необходимой энергией активации.

На рис. 8.2 приведена очень упрощенная схема энергетического профиля реакции $A \rightleftharpoons B$. В ходе реакции молекулы приобретают энергию, достаточную для активации, и оказываются в переходном состоянии; далее происходит образование продуктов. Энергию, необходимую для достижения переходного (активированного) состояния E_a , принято называть *энергией активации*. Для любой реально осуществляющейся реакции суммарная энергия исходных веществ должна быть большей, чем для продуктов. Как показано на рис. 8.2, в ходе реакции затраченная энергия активации E_a вновь освобождается, и суммарное изменение энергии в результате реакции равно разности уровней энергии для А и В.

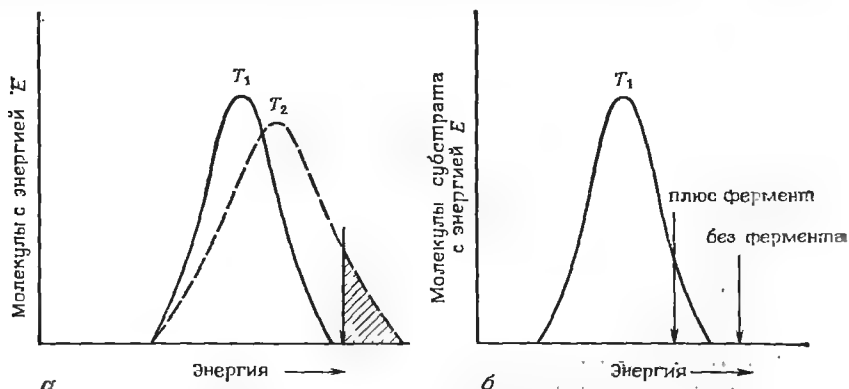


Рис. 8.1. а — распределение кинетической энергии в популяции молекул при температуре T_1 и при более высокой температуре T_2 . Стрелка показывает минимальную энергию, необходимую для того, чтобы молекула вступила в реакцию; следовательно, реакция не происходит при T_1 , но осуществляется при T_2 . б — кинетическая энергия популяции молекул субстрата при температуре T_1 . Стрелки показывают энергию, необходимую для осуществления реакции в отсутствие и в присутствии фермента. Обратите внимание на то, что в отсутствие фермента реакция не может осуществляться, но в присутствии фермента может протекать без повышения температуры.

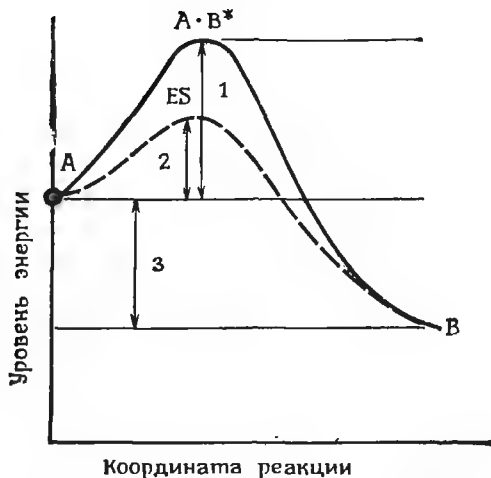


Рис. 8.2. Профили энергии некатализируемой и катализируемой реакций $A \rightleftharpoons B$. В случае некатализируемой реакции молекулы А должны для активирования перейти на более высокий уровень, требуемый для достижения переходного состояния $A \cdot B^*$, в котором могут претерпевать превращение, образуя В. Энергия, необходимая для перевода молекул в активированное состояние, — это энергия активации E_a ; она определяется разностью уровней энергии молекул А и активированного состояния $A \cdot B^*$, обозначенной цифрой 1. В катализируемой реакции энергия активации E_a , необходимая для образования активированного комплекса ES и обозначенная цифрой 2, значительно меньше, чем для некатализируемой реакции (обозначена цифрой 1). Разница уровней энергии молекул А и В одинакова для катализируемой и некатализируемой реакций.

Ферменты, подобно всем катализаторам, ускоряют химические реакции, снижая энергию активации специфической для данного фермента реакции. На рис. 8.1 б и 8.2 проиллюстрировано понижение энергии активации при ферментативных реакциях; рассмотрены запас энергии популяции молекул и уровни энергии исходных веществ и продуктов. Способы определения энергии активации и влияние температуры на катализируемые ферментами реакции более детально рассмотрены в разд. 8.4.4 и 8.4.5.

8.1.7. Некоторые ферменты участвуют в регуляции скоростей реакций

Живые организмы обычно не используют изменение температуры для регуляции скоростей метаболических реакций, и большинство из них не способно выживать при высоких температурах. Следовательно, катализируемые реакции должны осуществляться достаточно быстро при температуре жизнедеятельности организма. Более того, если бы важные биологические реакции осуществля-

лись без участия катализаторов, то нельзя было бы осуществить регуляцию их скоростей. Если же организм утрачивает контроль над скоростями происходящих в нем химических превращений, то он оказывается неспособным сохранять нормальную структуру и соответствующие функции; в результате наступает гибель организма.

Известны многочисленные регуляторные механизмы метаболизма (гл. 11); некоторые из них функционируют на уровне собственно ферментов. Вещества, которые либо увеличивают, либо уменьшают скорости катализируемых реакций, действуя непосредственно на фермент, называют *эффекторами*. Они изменяют структуру фермента таким образом, что изменяется скорость реакции. Механизмы регулирования активности ферментов рассмотрены ниже (разд. 8.7).

8.2. Номенклатура и классификация ферментов

Обычно названия ферментов отражают характер катализируемых ими реакций. Принято также добавлять суффикс «аза» к основной части названия атакуемого субстрата; например, уреаза действует на мочевины (urea), аргиназа — на аргинин, а тирозиназа — на тирозин. Продолжают использоваться также некоторые

Таблица 8.1
Классификация ферментов

Номер класса	Название класса	Характер действия
1	Оксидоредуктазы	Ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции
2	Трансферазы	Ферменты, катализирующие реакцию типа $X-Y+Z \rightleftharpoons X+Y-Z$
3	Гидролазы	Ферменты, катализирующие гидролитическое расщепление $\equiv C-O-$, $\begin{matrix} \diagup \\ C-N \\ \diagdown \end{matrix}$ и некоторых других связей
4	Лиазы	Ферменты, катализирующие реакции отщепления с образованием двойных связей или реакции присоединения по двойным связям
5	Изомеразы	Ферменты, катализирующие изменение геометрической или пространственной конфигурации молекул
6	Лигаза	Ферменты, катализирующие соединение двух молекул, сопровождающееся гидролизом богатой энергией связи

уже давно предложенные тривиальные названия (например, трипсин и пепсин). Международная комиссия по ферментам разработала полную, однако весьма сложную номенклатуру и классификацию ферментов. В табл. 8.1 приведены главные классы ферментов. Все ферменты сгруппированы в шесть классов, каждый из которых делится на подклассы и подподклассы. Так, оксидоредуктазы включают все ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции, трансферазы — реакции переноса и т. д.

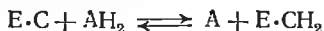
В классификации имеются некоторые неопределенности; например, некоторые трансферазы, по существу, катализируют окислительно-восстановительные реакции. В то же время использование классификации гарантирует необходимую однозначность в научной литературе. Некоторые из рекомендуемых комиссией названий не получили широкого распространения и не используются в данной книге. Следует поэтому запомнить название фермента и катализируемую им реакцию, когда они впервые встречаются в тексте. В общем случае названия ферментов связаны с общим типом реакции (дегидразы катализируют реакции дегидрирования, гидратазы — реакции гидратации, декарбоксилазы — реакции декарбоксилирования и т. д.).

8.3. Кофакторы и коферменты

Многие ферменты являются конъюгированными белками, содержащими простетические группы, не имеющие в своем составе аминокислот. Конъюгированный белок принято называть *холоферментом*, он может диссоциировать на белковый компонент — *апофермент* и небелковую простетическую группу — *кофактор*. Например, красновато-коричневая каталаза (гл. 13) диссоциирует в кислой среде с образованием бесцветного апофермента и феррипротопорфирина (гл. 13). Некоторые ферменты содержат металлы, нередко весьма прочно связанные с белком и отделяющиеся только при денатурации фермента. Супероксиддисмутаза (гл. 13) содержит два металла: по одному иону Cu^{2+} и Zn^{2+} в каждой из ее двух субъединиц; металлы трудно удаляются без нарушения конформации фермента. Следует отметить, что апофермент может снова взаимодействовать с обоими металлами, при этом регенерируется холофермент. Некоторые металлы, например Cu^{2+} в супероксиддисмутазе, непосредственно участвуют в каталитическом процессе. Металлы могут участвовать в поддержании нативной конформации фермента, и в этом случае их часто называют *активаторами*.

Некоторые органические кофакторы ферментов действуют как акцепторы или доноры атомов или функциональных групп, которые удаляются от субстрата или присоединяются к нему. Такие кофакторы часто легко диссоциируют из комплекса с ферментом, и в этом случае их принято называть *коферментами*. Более строго

их следовало бы рассматривать как *косубстраты*, поскольку они вместе с субстратами стехиометрически участвуют в каталитической реакции. Например, фермент Е содержит кофермент С и реагирует с субстратом АН_2 :



Одна молекула $\text{Е} \cdot \text{С}$ реагирует с одной молекулой АН_2 , образуя молекулы А и $\text{Е} \cdot \text{СН}_2$, при этом атомы водорода ковалентно связываются с С . Прежде чем сможет осуществиться превращение следующей молекулы АН_2 , молекула $\text{Е} \cdot \text{СН}_2$ должна возвратиться в состояние $\text{Е} \cdot \text{С}$. Это может быть осуществлено другим ферментом, катализирующим реакцию



или путем диссоциации СН_2 из комплекса с ферментом и превращения в С в результате еще одной ферментативной реакции.

Известны сотни ферментов, для функционирования которых необходимы металлы или органические кофакторы, однако количество металлов и кофакторов в организме ограничено. Многие органические кофакторы рассмотрены далее; некоторые из них не могут синтезироваться в организме млекопитающих и являются необходимыми компонентами пищи, или *витаминами*. Примерами кофакторов являются никотинамидадениндинуклеотид NAD , содержащий витамин никотинамид (гл. 13), и флавинадениндинуклеотид FAD , содержащий витамин рибофлавин (гл. 50). Действие этих и многих других кофакторов станет понятным при рассмотрении соответствующих реакций метаболизма.

8.4. Кинетика ферментативных реакций

Вопрос о скоростях ферментативных реакций имеет для биохимика первостепенное значение. При этом следует выделить две задачи: исследование нормального или нарушенного метаболизма организма в целом и выяснение природы собственно ферментативного процесса. Для оценки важности какой-либо синтетической реакции еще недостаточно знать, что она протекает в живых тканях; рассматриваемая реакция должна протекать достаточно быстро для обеспечения потребностей организма в продуктах реакции. Если своевременно не поставляется необходимый субстрат или же продукт реакции не удаляется достаточно быстро, могут возникать нарушения обмена веществ, проявляющиеся в виде заболевания. Естественно, метаболические нарушения возникают и в тех случаях, когда скорость физиологических процессов (реакций) значительно больше, чем в норме.

Как отмечено выше (разд. 8.1.5), скорость химической реакции сильно зависит от температуры и концентрации реагирующих веществ. Целесообразно рассмотреть вначале влияние концентрации на скорость некатализируемых реакций. В общем случае скорость химической реакции определяется как изменение концентрации c субстрата или продукта за единицу времени t . (Обычно концентрацию выражают в молях на литр, а время — в секундах.) Так, если c — начальная концентрация, которая уменьшается во времени, то скорость реакции $-dc/dt$. Скорость реакции может различным образом зависеть от «текущей» концентрации c . Она может не зависеть от c :

$$-\frac{dc}{dt} = k_0 = k_0 c^0 \quad \text{реакция нулевого порядка}$$

быть пропорциональной c :

$$-\frac{dc}{dt} = k_1 c = k_1 c^1 \quad \text{реакция первого порядка}$$

или быть пропорциональной второй степени (или реже более высокой степени) c :

$$-\frac{dc}{dt} = k_2 (c \cdot c) = k_2 c^2 \quad \text{реакция второго порядка}$$

Во всех случаях k — константа скорости реакции. Размерность k зависит от порядка реакции

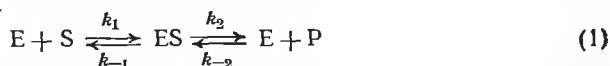
$$k = c^{1-n} t^n, \text{ где } n — \text{порядок реакции}$$

Следовательно, k_0 имеет размерность ct^{-1} , $k_1 — t^{-1}$, $k_2 — c^{-1}t^{-1}$. Из этого следует, что константы скорости для реакций различных порядков нельзя складывать или вычитать. Следовательно, только в реакциях первого порядка константа скорости не содержит размерность концентрации и только для реакций первого порядка период полупревращения, т. е. время, требуемое для уменьшения в 2 раза исходной концентрации, является постоянным для любых концентраций.

В случае ферментативных реакций, если известна молекулярная масса фермента, в размерность константы скорости входит концентрация фермента. Если молекулярная масса фермента не известна или препарат фермента не является чистым, скорость реакции часто относят к концентрации белка (миллиграмм белка на миллилитр или миллиграмм белкового азота на миллилитр). Согласно международному соглашению, одна единица любого фермента есть такое количество фермента, которое в определенных условиях катализирует превращение субстрата со скоростью 1 моль/с. Одна единица соответствует очень большому количеству фермента; для характеристики активности обычно используют нано- и пикоединицы.

8.4.1. Уравнения скорости реакции

Скорость всех ферментативных реакций зависит (при прочих постоянных условиях) от концентрации фермента и его субстрата. Рис. 8.3 иллюстрирует эту зависимость. В то время как при увеличении концентрации фермента скорость реакции увеличивается линейно, по мере возрастания концентрации субстрата (при постоянной концентрации фермента) она увеличивается гиперболически, достигая предельной максимальной скорости. Это указывает на то, что фермент должен иметь конечное число участков, взаимодействующих с субстратом; после заполнения всех участков дальнейшего увеличения скорости не происходит, и фермент оказывается насыщенным субстратом. Михаэлис и Ментен в 1913 г. одними из первых проанализировали кинетику ферментативного процесса и вывели общее уравнение скорости (известное в настоящее время как уравнение *Михаэлиса — Ментен*) для реакции, в которой происходит обратимое взаимопревращение одного субстрата и одного продукта. Они предположили, что фермент E взаимодействует с субстратом S , образуя фермент-субстратный комплекс ES , из которого затем освобождаются фермент и продукт P :



где k_1 , k_{-1} , k_2 , k_{-2} — константы скорости соответствующих стадий реакции. Это важное уравнение выведено здесь с учетом допущения Михаэлиса и Ментен о том, что происходит образование комп-

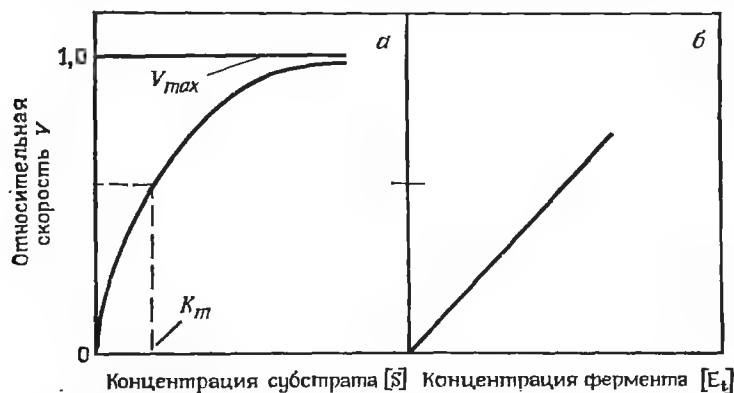


Рис. 8.3. Относительная начальная скорость как функция концентрации субстрата (а) и как функция концентрации фермента (б). Принято, что $V_{\max} = 1,0$; концентрация субстрата, при которой скорость равна $1/2 V_{\max}$, численно равна K_m . В отличие от гиперболической зависимости V от $[S]$ зависимость V от $[E]$ линейна.

лекса ES, а также некоторых дополнительных допущений, которые были введены позднее.

Принято, что концентрация субстрата S намного больше, чем концентрация фермента E; в рассмотрение включены только *начальные скорости*, т. е. скорости, определенные в условиях, когда только очень небольшая доля S превращается в P. В этом случае из P практически не образуется ES и стадией $E + P \rightarrow ES$ можно пренебречь. Общая концентрация фермента в системе $[E_t]$ равна

$$[E_t] = [E] + [ES] \quad (2)$$

где $[E]$ — концентрация свободного фермента, $[ES]$ — концентрация комплекса ES. Скорость реакции V равна

$$V = k_2 [ES] \quad (3)$$

Это, по существу, уравнение скорости для реакции (1), однако им нельзя воспользоваться для расчетов, поскольку ни k_2 , ни $[ES]$ не могут быть непосредственно измерены. *Максимальная скорость* $V_{\max}$ равна

$$V_{\max} = k_2 [E_t] \quad (4)$$

Ее можно определить, поскольку $V_{\max}$ не может превышать той скорости, которая наблюдается при полном насыщении фермента субстратом. Наконец, принимается допущение, что реакция протекает в *стационарных условиях*, т. е. скорость изменения $[ES]$ равна нулю ($d[ES]/dt=0$) и, следовательно, $[ES]$ не изменяется в течение времени, необходимого для измерения скорости.

Скорость v_f образования комплекса ES пропорциональна $[E]$ и $[S]$, как в любой реакции второго порядка:

$$v_f = k_1 [E] [S] = k_1 ([E_t] - [ES]) [S] \quad (5)$$

Скорость v_d распада комплекса ES равна

$$v_d = k_{-1} [ES] + k_2 [ES] = (k_{-1} + k_2) [ES] \quad (6)$$

Поскольку в стационарном состоянии $d[ES]/dt=0$, то $v_f=v_d$; следовательно,

$$k_1 ([E_t] - [ES]) [S] = (k_{-1} + k_2) [S] [ES] \quad (7)$$

Преобразуя уравнение (7), получаем

$$\frac{[S] ([E_t] - [ES])}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m \quad (8)$$

где K_m (включающая все три константы скорости) называется *константой Михаэлиса*; это весьма важный параметр, характеризующий каждую пару фермент — субстрат.

Преобразуя уравнение (8), получаем выражение для $[ES]$:

$$[ES] = \frac{[E_t] [S]}{K_m + [S]} \quad (9)$$

Подставляя в уравнение (9) V/k_2 вместо $[ES]$ [из уравнения (3)] и $V_{\max}/k_2$ вместо $[E_t]$ [из уравнения (4)], получаем окончательное выражение уравнения Михаэлиса — Ментен

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (10)$$

Рассмотрим теперь методы определения $V_{\max}$ и K_m по результатам измерения V при различных концентрациях $[S]$. По гиперболической кривой, приведенной на рис. 8.3, можно определить K_m , однако определить с необходимой точностью $V_{\max}$ нельзя, поскольку в эксперименте часто не удастся достичь концентрации субстрата, достаточной для насыщения фермента. Используя, однако,

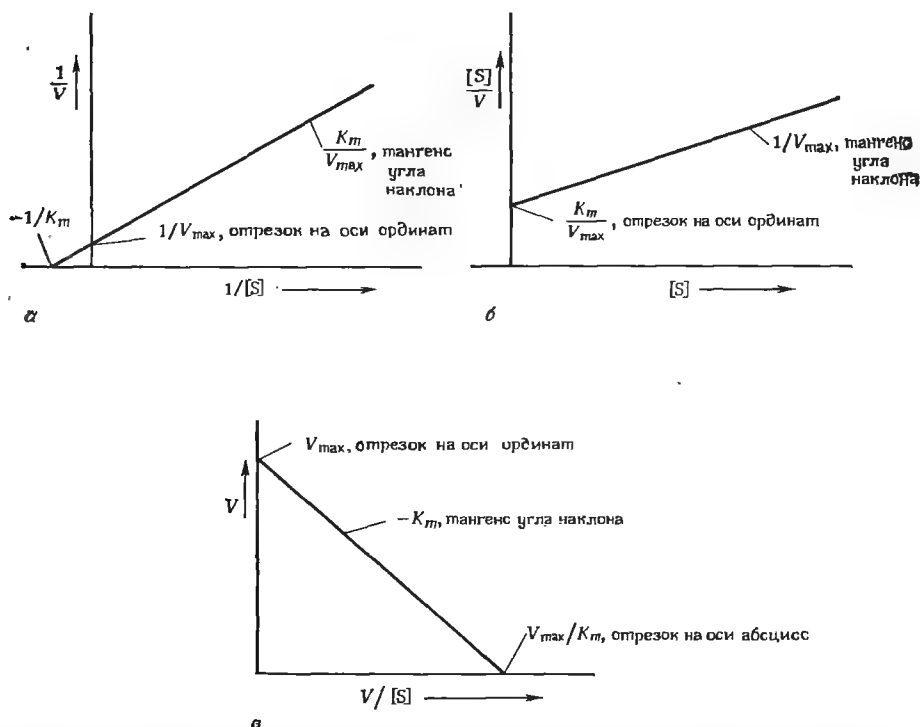


Рис. 8.4. Зависимости, используемые для определения K_m и $V_{\max}$ ферментативных реакций. Для нескольких концентраций субстрата вычисляют скорости и строят соответствующие зависимости. По наклонам прямых и отрезкам, отсекаемым на осях, находят K_m и $V_{\max}$. Зависимости построены согласно: α — уравнению (11); δ — уравнению (12); в — уравнению (13).

выражение, обратное уравнению (10), получаем следующее линейное уравнение, называемое *уравнением Лайнуивера — Бэрка*:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (11)$$

График зависимости $1/V$ от $1/[S]$, приведенный на рис. 8.4, представляет собой прямую с наклоном $K_m/V_{\max}$, отсекающую на оси ординат отрезок $1/V_{\max}$. Поскольку на графике легко измерить угол наклона и отрезок на оси ординат, то можно достаточно точно определить $V_{\max}$ и K_m . Можно также умножить обе части уравнения (11) на $[S]$, тогда

$$\frac{[S]}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{[S]}{V_{\max}} \quad (12)$$

После умножения обеих частей уравнения (11) на $V_{\max}$ и соответствующих преобразований получим

$$V = -K_m \frac{V}{[S]} + V_{\max} \quad (13)$$

Графики уравнений (12) и (13) также представляют собой прямые; их можно использовать для определения K_m и $V_{\max}$, как показано на рис. 8.4.

8.4.2. Природа K_m

Особый интерес представляет следующее уравнение, полученное путем решения уравнения (10) относительно K_m :

$$K_m = [S] \left(\frac{V_{\max}}{V} - 1 \right) \quad (14)$$

При такой концентрации $[S]$, когда $V = 1/2 V_{\max}$, уравнение (11) преобразуется в следующее:

$$K_m = [S]$$

Следовательно, K_m совпадает с концентрацией субстрата (в молях на литр), если скорость реакции равна половине максимальной $V_{\max}$.

K_m является сложной константой, поскольку $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$. Следует рассмотреть три возможности. Во-первых, если k_{-1} значительно больше k_2 , то можно пренебречь k_2 , и $K_m = k_{-1}/k_1$. Тогда K_m — термодинамическая константа равновесия для обратимого образования комплекса ES. Во-вторых, если k_2 значительно больше k_{-1} , то $K_m = k_2/k_1$, и K_m — стационарная константа, содержащая две независимые константы скорости. И наконец, в-третьих, если k_{-1} и k_2 — величины одного порядка, то K_m определяется

всеми тремя константами скорости. При исследовании различных ферментных систем наблюдаются все три рассмотренных выше случая.

Уравнение скорости Михаэлиса — Ментен (10) выведено при допущении, что скорость стадии $P + E \rightarrow EP$ практически равна нулю, поскольку определяется начальной скоростью прямой реакции. Это уравнение, однако, применимо также и в случае ферментативных реакций, константа равновесия которых близка к единице, т. е. для обратимого взаимопревращения S и P. Так, уравнение Холдена связывает K_p с константами скоростей для прямой и обратной реакций, а также с K_m и $V_{\max}$:

$$K_p = \frac{[P]_p}{[S]_p} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}} = \frac{V_{\max}^S K_m^P}{V_{\max}^P K_m^S} \quad (15)$$

где верхние индексы S и P относят соответствующие параметры к субстрату и продукту соответственно. K_m^P и $V_{\max}^P$ для обратной реакции определяют таким же путем, как было описано выше для прямой реакции. Для обратимой системы правильность определения кинетических констант по уравнению (11) может быть проверена по уравнению (15), поскольку K_p легко рассчитать по равновесным концентрациям. Для фермента *фумаразы*, которая катализирует обратимое взаимопревращение $\text{фумарат} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{малат}$, константа равновесия, рассчитанная по известным концентрациям малата и фумарата, составляет $K_p = 4,4$. Значение K_p можно найти, используя следующие определенные экспериментально параметры: $K_m^{\text{мал}} = 2,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $K_m^{\text{фум}} = 0,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $V_{\max}^{\text{мал}} = 54\,000$ мин⁻¹ и $V_{\max}^{\text{фум}} = 48\,000$ мин⁻¹.

Уравнение (1) отражает механизм ферментативной реакции в крайне упрощенном виде, поскольку несомненно, что в ходе катализа фермент образует не один, а большее число промежуточных комплексов. Например, вначале фермент связывает субстрат, образуя комплекс ES, затем переходное состояние ESP, далее EP и, наконец, $E + P$:



Включение дополнительных комплексов, как например, в уравнении (16), не изменяет общей формы уравнения Михаэлиса — Ментен (10), вывод которого был сделан на примере упрощенного уравнения (1).

8.4.3. Порядок реакции при ферментативном катализе

Порядок ферментативной реакции может изменяться во времени; для обсуждения этого вопроса следует воспользоваться кри-

вой Михаэлиса — Ментен (рис. 8.5). Рассмотрим соотношения, получаемые из уравнения (9) для высоких и низких концентраций субстрата, поскольку именно такие условия характерны для начала и завершения катализируемых ферментами реакций. Если $[S]$ много больше K_m , т. е. концентрация субстрата очень высока (плато на кривой рис. 8.5), то

$$-\frac{d[S]}{dt} = V = V_{\max} = k_2 [E_t] \quad (17)$$

Скорость реакции постоянна (при данной концентрации фермента). В этих условиях фермент насыщен субстратом и реакция протекает с максимальной скоростью, т. е. дальнейшее увеличение $[S]$ не изменяет скорости.

При снижении концентрации субстрата до значений, значительно меньших по сравнению с K_m (нижняя часть кривой на рис. 8.5), видно, что

$$-\frac{d[S]}{dt} = V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m} = \frac{k_2 [E_t] [S]}{K_m} \quad (18)$$

т. е. скорость реакции прямо пропорциональна концентрации субстрата.

8.4.4. Кинетика двухсубстратных ферментативных реакций

Большинство ферментов катализирует реакции, в которых участвует не один, а большее число субстратов, например $A + B \rightleftharpoons C + D$. В ходе этих реакций также происходит образование фермент-субстратных комплексов, подобно тому как это имеет место в односубстратных реакциях, и при исследовании кинетики двухсубстратных реакций могут быть определены K_m для каждого из субстратов и $V_{\max}$ для реакций. Константы K_m для каждого из субстратов определяют графически [уравнения (11—13)] из за-

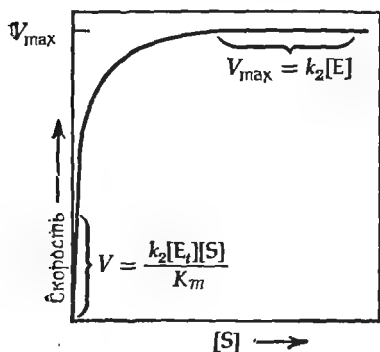
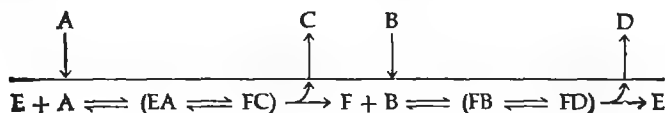


Рис. 8.5. Теоретический график зависимости скорости реакции от концентрации субстрата. Когда $V = V_{\max}$, скорость не зависит от концентрации субстрата (реакция нулевого порядка). Когда концентрация субстрата мала по сравнению с K_m , скорость пропорциональна концентрации субстрата (реакция первого порядка).

висимости начальной скорости от концентрации одного из субстратов при фиксированной (обычно насыщающей) концентрации другого субстрата.

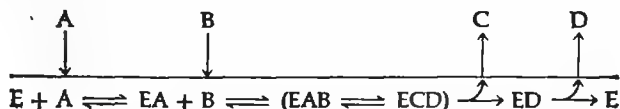
Выведены уравнения скорости для двухсубстратных реакций, аналогичные уравнению Михаэлиса — Ментен; использование этих уравнений способствовало выяснению общего механизма изучаемых реакций и позволило определить значения соответствующих кинетических параметров K_m и V_{max} . Эти уравнения весьма сложны, и интересующиеся могут обратиться к более специализированным руководствам. Полезно, однако, рассмотреть два основных механизма двухсубстратных реакций: *механизм двойного замещения и последовательный механизм*.

Если реакция $A + B \rightleftharpoons C + D$ осуществляется по механизму двойного замещения, то вначале субстрат А присоединяется к ферменту, образуя комплекс ЕА, затем освобождается первый продукт С; при этом образуется стабильный интермедиат F, отличающийся от Е. Далее интермедиат F взаимодействует со вторым субстратом В, образуя фермент-субстратный комплекс FВ, из которого образуется второй продукт D и освобождается фермент Е. Реакции этого типа могут быть записаны различным образом, приводимая ниже форма записи хорошо иллюстрирует механизм двойного замещения:



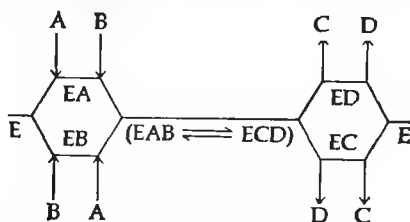
где А, В, С и D — субстраты и продукты, Е — фермент, F — стабильный интермедиат; обозначения, взятые в скобки, — предполагаемые интермедиаты. По горизонтали последовательно расположены формы фермента, образующиеся в ходе реакции, а стрелки указывают на присоединение субстратов и диссоциацию продуктов. Этот механизм называют также «пинг-понг»-механизмом. По такому механизму осуществляется, например, переаминирование, катализируемое глутамат-аспартат-аминотрансферазой (гл. 20).

Последовательные механизмы представлены двумя видами — *упорядоченным и неупорядоченным*. В противоположность пинг-понг-механизму при последовательном механизме оба субстрата должны соединиться с ферментом и образовать тройной комплекс, прежде чем произойдет образование продукта. Реакцию по упорядоченному механизму можно записать в виде следующей схемы:



Субстрат А связывается с ферментом Е, образуя комплекс ЕА, который в свою очередь связывает субстрат В. Тройной комплекс ЕАВ превращается в тройной комплекс ЕСD, из которого последовательно (как показано) освобождаются продукты. По упорядоченному механизму функционируют, например, фосфофруктокиназа (гл. 14) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (гл. 14).

В других случаях на ферменте Е имеются независимые участки связывания для А и В, и скорость реакции не зависит от того, какой субстрат А или В связывается с ферментом первым. В таких случаях говорят, что механизм является неупорядоченным. Если также при распаде тройного комплекса ЕСD ни один из продуктов не имеет перед другим «преимуществ» освобождаться первым, то схема неупорядоченного механизма может быть изображена следующим образом:



Примерами ферментов, функционирующих по неупорядоченному механизму, являются UDPгалактоза : N-ацетилглюкозамин-галактозилтрансфераза (разд. 8.7.2.3) и креатинкиназа (гл. 10).

Известны более сложные кинетические механизмы для реакций с тремя и даже четырьмя субстратами. Такие реакции могут осуществляться либо по последовательному механизму, либо по пинг-понг-механизму, либо по смешанному механизму.

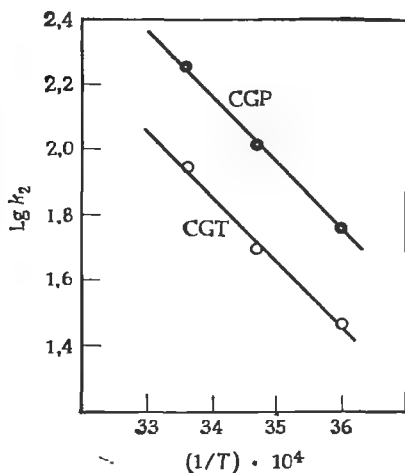
8.4.5. Влияние температуры

Константа равновесия любой химической реакции, как и скорость реакции, сильно зависит от температуры, и ферментативные реакции не являются исключением. Влияние температуры на константу равновесия химической реакции выражается уравнением Вант-Гоффа

$$2,3 \lg K = C - \frac{\Delta H}{RT} \quad (19)$$

где ΔH — тепловой эффект реакции (в калориях на моль), R — газовая постоянная, равная $1,98 \text{ кал} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{град}^{-1}$, T — абсолютная температура, C — константа интегрирования. Из уравнения следует, что график зависимости $\lg K$ от обратной температуры $1/T$ должен быть прямолинейным. Наклон прямой равен $\Delta H/2,3 R$. Влия-

Рис. 8.6. Влияние температуры на константу скорости k_2 гидролиза карбобензоксиглицилфенилаланина (CGP) и карбобензоксиглицилтриптофана (CGT) кристаллической карбоксипептидазой. Приведены зависимости $\lg k_2$ от обратной абсолютной температуры. Кажущиеся энергии активации E_a составляют 9900 кал/моль для CGT и 9600 кал/моль для CGP. [Lymry R., Smith E. L., Glantz R. R., J. Am. Chem. Soc., 73, 4330, 1951.]



ние температуры на скорость реакции выражается уравнением Аррениуса

$$2,3 \lg k = B - \frac{E_a}{RT} \quad (20)$$

Это уравнение имеет такой же вид, как уравнение (19), оно выражает константу скорости реакции k через T , R и E_a , энергию активации (разд. 8.1.7) в калориях на моль, и константу B , которая (качественно) характеризует частоту столкновений молекул и необходимость определенной взаимной ориентации сталкивающихся молекул. Для двух значений температуры по уравнению (20) можно записать

$$2,3 \lg \frac{k'}{k''} = \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T''} - \frac{1}{T'} \right) \quad (21)$$

где k' и k'' — константы скорости при температурах T' и T'' соответственно.

На рис. 8.6 показано влияние температуры на константу скорости k_2 при гидролизе карбоксипептидазой двух субстратов. Это типичный график Аррениуса для катализируемой ферментом реакции; он показывает, что в данном случае зависимость $\lg k_2$ от $1/T$ линейна в области между 5 и 25°C; по наклону прямой можно рассчитать E_a . При повышении температуры скорость ферментативных реакций увеличивается только до определенного максимального значения; при дальнейшем повышении температуры происходит снижение скорости реакции вследствие тепловой денатурации фермента.

8.4.6. Энергия активации

Энергия активации — это энергия, необходимая для перевода молекул в реакционноспособное состояние (разд. 8.1.6). Катализатор понижает энергию активации реакции, которая может протекать и спонтанно в отсутствие катализатора. В табл. 8.2 приведены энергии активации некоторых процессов. Энергия активации разложения пероксида водорода составляет 18 000 кал/моль; она

Таблица 8.2
Энергии активации некоторых реакций при ферментативном
и неферментативном катализе

Реакция	Катализатор	E_a , кал/моль
Разложение пероксида водорода	Без катализатора	18 000
	Коллоидная платина	11 700
	Каталаза	<2 000
Гидролиз этилбутирата	Водородные ионы	16 800
	Гидроксидные ионы	10 200
	Панкреатическая липаза	4 500
Гидролиз казеина	Водородные ионы	20 600
	Трипсин	12 000
Гидролиз сахарозы	Водородные ионы	25 600
	Дрожжевая инвертаза	8 000—10 000
Гидролиз β -метилглюкозида	Водородные ионы	32 600
	β -Глюкозидаза	12 200

понижается до 11 700 кал/моль в присутствии в качестве катализатора коллоидной платины и значительно уменьшается в случае ферментативной реакции. Очевидно, что для рассматриваемой реакции каталаза является значительно более эффективным катализатором по сравнению с неорганическим катализатором. Каталаза столь эффективна, что ферментативная реакция характеризуется лишь весьма незначительной энергией активации. Известно, что разложение пероксида водорода каталазой протекает со скоростью, которая является одной из наивысших для ферментативных реакций.

Рассмотрение других данных табл. 8.2 показывает, что подобные же соотношения характерны и для других систем: неорганический катализатор понижает энергию активации, но фермент снижает ее в еще большей степени. О большой эффективности ферментов как катализаторов свидетельствуют высокие скорости ферментативных реакций при физиологических температурах. Другими словами, благодаря низкому значению E_a реакция может

протекать с высокой скоростью при относительно низкой температуре. Это можно легко показать, сопоставляя значения констант скоростей данной реакции, протекающей при определенной температуре (37 °C), при различных энергиях активации. В качестве примера можно рассмотреть приведенные в табл. 8.2 данные для гидролиза сахарозы, катализируемого дрожжевой инвертазой и водородными ионами.

Согласно уравнению (20), для ферментативной реакции (индекс e) имеем

$$\lg k_e = \frac{B_e}{2,3} - \frac{8000}{2,3RT} \quad (22)$$

и для реакции, катализируемой водородными ионами (индекс h):

$$\lg k_h = \frac{B_h}{2,3} - \frac{25\,600}{2,3RT} \quad (23)$$

Предположим, что B_e и B_h примерно равны. Для того чтобы найти отношение констант скоростей рассматриваемых реакций (катализируемой ферментом и катализируемой водородными ионами), вычтем уравнение (23) из уравнения (22) и подставим значения $R = 1,98$ и $T = 37 + 273 = 310$. Получаем

$$\lg \frac{k_e}{k_h} = \frac{25\,600 - 8\,000}{2,3 \cdot 1,98 \cdot 310} = \frac{17\,600}{1\,415} = 12,4 \quad (24)$$

■

$$\frac{k_e}{k_h} = 2,5 \cdot 10^{12} \quad (25)$$

Другими словами, можно ожидать, что при одной и той же температуре константа скорости ферментативной реакции в $\sim 10^{12}$ раз выше константы скорости реакции, катализируемой водородными ионами.

8.4.7. Влияние pH

pH оказывает выраженное влияние на скорость ферментативных реакций. Для каждого фермента имеется определенное значение pH, при котором скорость реакции оптимальна (оптимум pH), при отклонении в любую сторону от этого значения pH скорость реакции снижается. В табл. 8.3 приведены значения оптимумов pH для ряда хорошо изученных ферментов. Очевидно, что значения оптимума pH находятся в очень широкой области, например кислая среда для пепсина и щелочная среда для щелочной фосфатазы. На практике при проведении исследований с использованием ферментов необходимо поддерживать постоянное значение pH с помощью соответствующих буферных растворов;

Таблица 8.3

Оптимумы pH действия некоторых гидролитических ферментов

Фермент	Субстрат	Оптимум pH
Пепсин	Яичный альбумин	1,5
	Казеин	1,8
	Гемоглобин	2,2
	Карбобензоксиглутамилтирозин	4,0
α -Глюкозидаза	α -Метилглюкозид	5,4
	Мальтоза	7,0
Уреаза	Мочевина	6,4—6,9
Трипсин	Белки	7,8
Панкреатическая α -амилаза	Крахмал	6,7—7,2
β -Амилаза солода	Крахмал	4,5
Карбоксипептидаза	Различные субстраты	7,5
Щелочная фосфатаза плазмы	2-Глицерофосфат	9—10
Кислая фосфатаза плазмы	2-Глицерофосфат	4,5—5,0
Аргиназа	Аргинин	9,5—9,9

следует, однако, иметь в виду, что природа буфера может влиять на положение оптимума pH.

Влияние pH на скорость ферментативных реакций может быть обусловлено различными факторами. Ферменты, подобно другим белкам, являются амфолитами и имеют большое число ионогенных групп. Если функционирование фермента зависит от наличия некоторых специфических группировок, то каждая из них в данных условиях должна находиться в определенном состоянии (неионизированном или ионизированном). Нередко оказывается возможным идентифицировать участвующие в катализе ионогенные группы активного центра путем анализа зависимости активности фермента от pH и сопоставления полученных данных с известными величинами pK' ионогенных групп белков (табл. 5.2). В качестве примеров можно указать на идентификацию каталитически активных остатков гистидина в активных центрах трипсина, химотрипсина и субтилизина и тиоловой группы в активном центре папаина (гл. 9). На участие ионогенных групп в функционировании ферментов указывает также влияние ионной силы на скорость ряда ферментативных реакций (это влияние сильно выражено при действии карбоксипептидазы и уреазы). Такого рода эффект обычно наблюдается при неферментативном катализе, осуществляемом ионогенными соединениями.

Во многих случаях субстраты являются электролитами, и реакция может осуществляться лишь с определенными (ионизированными или неионизированными) их формами.

Концентрация водородных ионов может влиять на действие ферментов и косвенным путем, поскольку многие ферменты, как и вообще белки, стабильны только в ограниченном интервале рН, наиболее часто при нейтральных рН. В то же время известны исключения; наиболее необычные свойства проявляет пепсин, который стабилен в кислой среде и быстро инактивируется в нейтральных и щелочных растворах.

Многие ферменты являются конъюгированными белками, небелковый компонент которых относительно слабо связан с белком. Поскольку для ферментативной активности необходимы оба компонента, то в условиях, вызывающих диссоциацию кофактора, происходит утрата активности. Следует отметить, что подобная диссоциация часто является обратимой; например, пероксидаза диссоциирует на два неактивных компонента в кислой среде, однако при рН 7 активность восстанавливается.

8.5. Ингибирование ферментов

Скорость катализируемой ферментом реакции может быть замедлена специфическими ингибиторами, т. е. соединениями, которые, взаимодействуя с ферментом, препятствуют образованию нормального фермент-субстратного комплекса, уменьшая тем самым скорость реакции. Некоторые ингибиторы ферментов являются для живых организмов ядами (например, цианид, сероводород и монооксид углерода). Поскольку токсичность многих ядов обусловлена их ингибирующим действием на ферменты, то ряд проблем токсикологии следует рассматривать с энзимологических позиций. Многие лекарственные препараты также являются ингибиторами, поэтому развитие молекулярной фармакологии также в значительной мере связано с исследованиями процессов ингибирования ферментов. Такого рода исследования позволяют получить также весьма важную информацию о самих ферментах.

Различают три типа обратимого ингибирования ферментов: *конкурентное, неконкурентное и бесконкурентное*; их можно различить с помощью кинетического анализа.

8.5.1. Конкурентное ингибирование

Конкурентные ингибиторы способны обратимо связываться с активным центром фермента и конкурировать с субстратом за активный центр. Если активный центр занят ингибитором, он не способен связывать субстрат. Взаимодействие конкурентного ин-

гибитора I с ферментом E можно записать таким же образом, как и взаимодействие субстрата с ферментом, при этом, конечно, следует помнить, что ингибитор не подвергается химическим изменениям и не превращается в продукт:

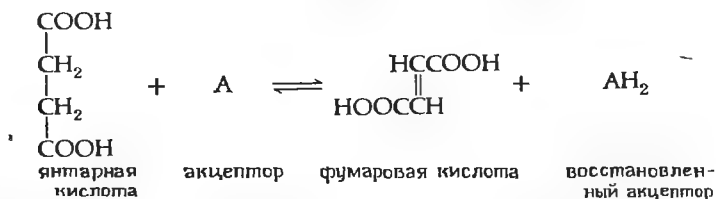


K_i — константа диссоциации для фермент-ингибиторного комплекса EI:

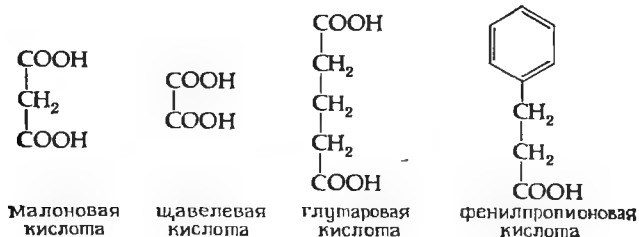
$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (27)$$

Поскольку образование EI зависит от [I] точно так же, как образование ES зависит от [S], наблюдаемая в присутствии конкурентного ингибитора скорость реакции (при постоянной концентрации фермента) зависит от относительных концентраций S и I.

Одним из первых примеров (ставшим в настоящее время классическим) конкурентного ингибирования является действие малоновой кислоты на *сукцинатдегидрогеназу*, которая в присутствии подходящего акцептора водорода A катализирует реакцию



Многие соединения, структурно сходные с янтарной кислотой, но не способные дегидрироваться, могут соединяться с ферментом, блокировать активный центр и тормозить протекание нормальной реакции. Некоторые ингибиторы сукцинатдегидрогеназы приведены ниже.



Наиболее мощным ингибитором из указанных выше является малоновая кислота. При отношении концентраций ингибитора и субстрата 1 : 50 степень ингибирования фермента составляет 50%.

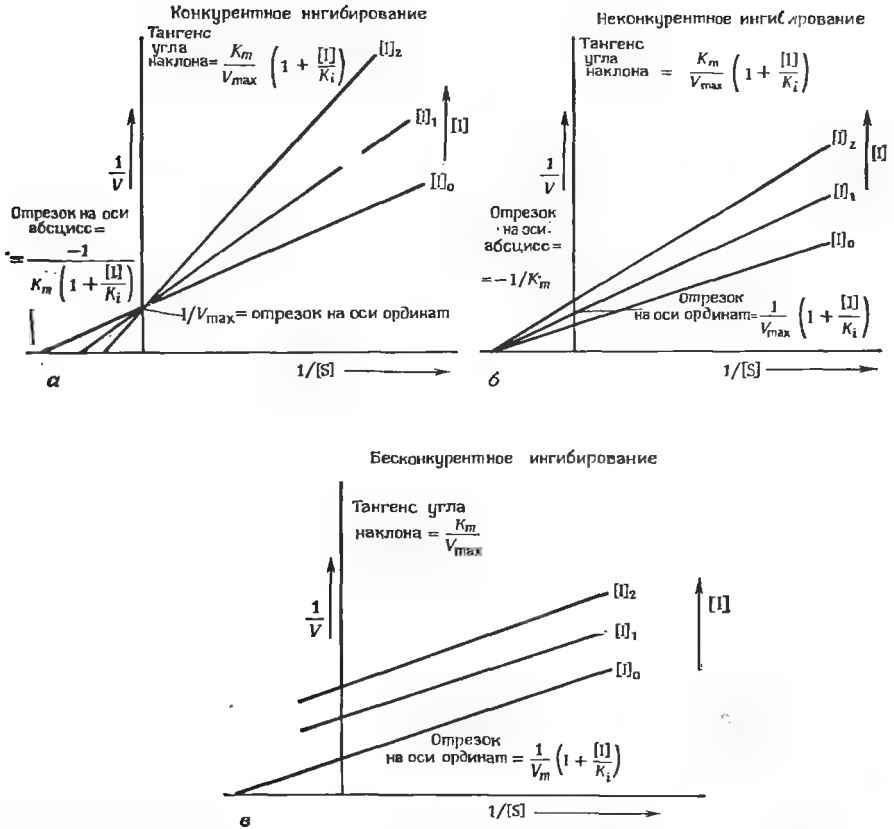


Рис. 8.7. Зависимость $1/V$ от $1/[S]$, иллюстрирующая различные типы ингибирования ферментативных реакций: а — конкурентное ингибирование [уравнение (28)]; б — неконкурентное ингибирование [уравнение (33)]; в — бесконкурентное ингибирование [уравнение (35)]. K_m и $V_{\max}$ (для неингибированных реакций) и K_i (для ингибированных реакций) определяют по наклонам прямых и отрезкам, отсекаемым на осях.

Увеличение концентрации субстрата при постоянной концентрации ингибитора снижает степень ингибирования, и, напротив, понижение концентрации субстрата увеличивает степень ингибирования. Если бы янтарная и малоновая кислоты связывались с разными участками фермента, было бы трудно объяснить, почему они должны конкурировать друг с другом. Поскольку наблюдается конкуренция, сделано заключение, что они взаимодействуют с ферментом в одном и том же участке активного центра. Структуры всех конкурентных ингибиторов имеют некоторое сходство с соответствующими субстратами.

Конкурентное ингибирование может быть выявлено с помощью кинетического анализа: следует изучить влияние концентрации ингибитора на зависимость V от $[S]$, используя уравнение Лайнувера — Бэрка (11), как это показано на рис. 8.7. Действие конкурентных ингибиторов подчиняется следующему уравнению, в которое входят K_i (константа диссоциации комплекса EI) и $[I]$ (концентрация I):

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (28)$$

Все другие обозначения в уравнении (28) идентичны соответствующим в уравнении (11). На рисунке видно, что при конкурентном ингибировании величина отрезка $1/V_{\max}$ остается такой же, как и в отсутствие ингибитора, однако тангенс угла наклона меняется и становится равным $1 + ([I]/K_i)$. Этого можно было ожидать, так как при насыщающих концентрациях субстрата S , получаемых при экстраполяции на $1/[S]=0$, концентрация S столь высока, что связывания ингибитора с активным центром не происходит. Степень ингибирования при меньших концентрациях субстрата зависит от отношения $[I]/[S]$ и значения K_i .

8.5.2. Неконкурентное ингибирование

При рассматриваемом типе ингибирования степень его зависит только от концентрации ингибитора и не зависит от концентрации субстрата, причем в отличие от конкурентного ингибирования образование EI происходит не на том участке фермента, с которым связывается субстрат:



и



где EI и ESI являются неактивными. Следует рассмотреть две константы диссоциации

$$K_i^{EI} = \frac{[EI]}{[E][I]} \quad (31)$$

и

$$K_i^{ESI} = \frac{[ESI][I]}{[ESI]} \quad (32)$$

Уравнение для неконкурентного ингибирования (в двойных обратных величинах) запишется следующим образом:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad (33)$$

где обозначения те же, что и в уравнении (28), а K_i — константа ингибирования, учитывающая суммарное влияние K_i^{EI} и K_i^{ESI} (которые могут иметь как одинаковое, так и разное значение). Результаты графического анализа уравнения (33), приведенные на рис. 8.7, показывают, что как наклон, так и величина отрезка, отсекаемого на оси ординат, отличаются от соответствующих параметров для неингибированной реакции на величину $1 + [I]/K_i$. Неконкурентные ингибиторы взаимодействуют не с активным центром, а с другим участком фермента; при этом они вызывают существенные изменения конформации фермента, в результате чего нарушается нормальное взаимодействие активного центра с субстратом. Примерами неконкурентных ингибиторов являются ионы тяжелых металлов, например Ag^+ , Hg^{2+} и Pb^{2+} , реагирующие с тиоловыми группами фермента, и хелат-образующие реагенты, взаимодействующие с ионами металлов, необходимыми для активности.

Многие соединения необратимо взаимодействуют с ферментом, образуя ковалентные производные либо в области активного центра, либо в другой части молекулы (непосредственно не участвующей в фермент-субстратном взаимодействии). Эти соединения в строгом смысле не являются неконкурентными ингибиторами, поскольку они необратимо инактивируют фермент. Например, единственная тиоловая группа активного центра папаина быстро реагирует с йодацетатом, в результате образуется остаток S-карбоксиметилцистеина (разд. 6.1.1). Степень инактивации папаина этим ингибитором прямо пропорциональна степени S-карбоксиметилирования. Йодацетат инактивирует также некоторые ферменты, у которых тиоловые группы локализованы вне области активного центра; в этих случаях потеря активности связана с изменением конформации фермента. В гл. 9 рассмотрен ряд других соединений, образующих ковалентные производные специфических групп ферментов и нашедших широкое применение как реагенты для идентификации групп, ответственных за ферментативную активность.

8.5.3. Бесконкурентное ингибирование

Ингибирование бесконкурентного типа наблюдается в том случае, когда ингибитор обратимо взаимодействует только с ES, что приводит к комплексу ESI, не способному образовывать продукты. В этом случае

$$K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (34)$$

и кинетика ингибирования описывается следующим уравнением:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad (35)$$

[обозначения те же, что и в уравнениях (28) или (33)]. При графическом анализе (рис. 8.7) видно, что изменяется только величина отрезка, отсекаемого на оси ординат, а наклон прямой остается таким же, как и для неингибированной реакции. При увеличении концентрации субстрата действие бесконкурентного ингибитора (аналогично действию неконкурентного ингибитора) не снижается. Ингибирование рассматриваемого типа обычно встречается в случае ферментативных реакций с участием двух (или большего числа) субстратов.

8.6. Ингибиторы метаболизма: антиметаболиты

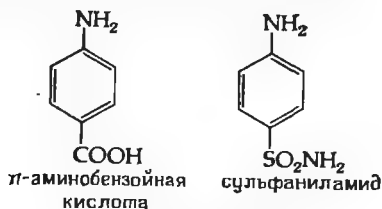
Значение результатов исследований по «торможению» активности ферментов соединениями, сходными по структуре с естественными субстратами, выходит за рамки исследования изолированных ферментных систем. Так, фармакологам уже давно известно, что соединения, имеющие структуру, сходную со структурой определенных физиологически активных веществ, могут конкурировать с последними. Хотя во многих случаях сведения о ферментах, участвующих в реализации рассматриваемого физиологического явления, отсутствуют, имеются указания, что многие фармакологически активные соединения изменяют течение метаболических процессов в результате их действия на ферменты или ферментные системы.

Известно, что высшие животные и многие микроорганизмы не способны синтезировать некоторые органические соединения, являющиеся для них жизненно необходимыми, и должны получать их в готовом виде. Потребности разных видов различны; к числу необходимых соединений могут относиться определенные аминокислоты, жирные кислоты, представители гетерогенной по структуре группы веществ, известной под названием витамины, определенные пурины, пиримидины и т. д. Эти необходимые для выживания или для роста соединения либо непосредственно используются организмом при синтезе белков, нуклеиновых кислот (и других соединений), либо трансформируются в необходимые для клеток продукты. Использование необходимых *метаболитов* зависит от определенных ферментов; эти ферменты могут ингибироваться *антиметаболитами* — соединениями, имеющими сходную с метаболитами структуру.

Антиметаболиты могут также блокировать использование метаболитов, синтезируемых в самом организме. Это обстоятельство является основой важного метода изучения метаболических

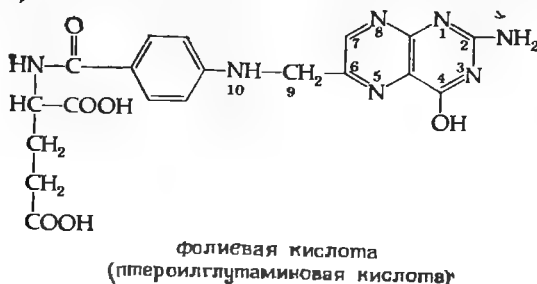
путей, поскольку во многих случаях торможение роста организма может быть преодолено путем добавления необходимого метаболита. Таким образом, исследования с использованием антиметаболитов представляют интерес в двух отношениях: во-первых, они позволяют обнаружить метаболиты и факторы роста, необходимые для различных видов, а во-вторых, они являются средством поиска мощных ингибиторов роста патогенных микроорганизмов и опухолевых клеток. Антиметаболиты, выделенные из живых организмов (бактерий, грибов, актиномицетов и др.), обычно называют *антибиотиками*.

Хотя такие синтетические антибактериальные вещества, как арсфенамин и сульфонамиды, были получены в результате эмпирических поисков уже относительно давно, началом рационального исследования антиметаболитов явилось наблюдение, показавшее, что торможение бактериального роста в присутствии сульфаниламида конкурентно снимается *n*-аминобензойной кислотой, роль которой как фактора роста была впервые установлена именно в этих исследованиях. Структурное сходство рассматриваемых соединений очевидно, и наблюдаемое явление подобно конкурентному торможению изолированного фермента.



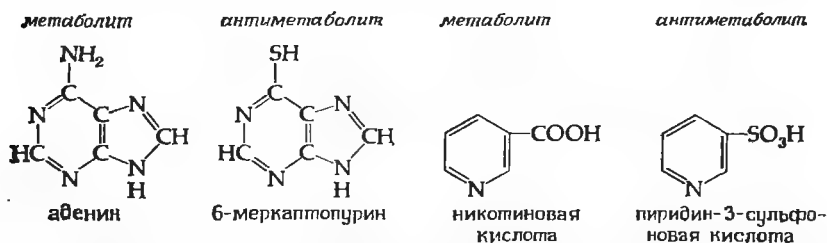
Установлено, что *n*-аминобензойная кислота конкурентно снимает ингибирующее действие всех сульфонамидов, имеющих структуру $\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{NHR}$, например сульфатуанидина, сульфатуазида, сульфатуазида и сульфатуазида.

Организмы, для роста которых необходима *n*-аминобензойная кислота (ПАБК), используют ее для синтеза фолиевой кислоты (см. ниже). Рост этих организмов тормозится сульфонамидами, и



это торможение может быть обращено ПАБК. Рост организмов, которые нуждаются в фолиевой кислоте и не могут использовать для ее синтеза ПАБК, не тормозится сульфонамидами. Следовательно, сульфонамиды тормозят ферментативную стадию (или стадии), находящуюся на пути синтеза фолиевой кислоты из *p*-аминобензойной кислоты и других метаболитических предшественников. Эта упрощенная картина служит иллюстрацией того, насколько полезным оказались сульфонамиды в выяснении роли ПАБК в метаболизме бактерий. Эффективное использование сульфонамидов при лечении бактериальных инфекций у человека обусловлено, вероятно, тем, что человек нуждается в готовой фолиевой кислоте и не может синтезировать ее из ПАБК. Таким образом, сульфонамиды блокируют метаболитические реакции, существенные для определенных бактерий, и в то же время не влияют на организм хозяина, у которого не происходит синтеза фолиевой кислоты из ПАБК.

Были синтезированы многие тысячи соединений с целью получения новых антиметаболитов. Сопоставление приводимых ниже структур синтетических антиметаболитов и соответствующих метаболитов может служить иллюстрацией тех предпосылок, на которых основан поиск эффективных ингибиторов.



Некоторые антагонисты фолиевой кислоты были использованы в экспериментах (и в ограниченном масштабе в клинике) при лечении лейкемии и других заболеваний опухолевой природы. Так, 4-аминоптеройлглутаминовая кислота (аминоптерин) тормозит рост некоторых видов опухолей. Это стимулировало широкий поиск других потенциальных ингибиторов новообразований; многие из этих исследований основываются на концепции антиметаболитов.

8.7. Регуляция ферментативной активности

8.7.1. Аллостерические ферменты

Как уже обсуждалось выше, ферменты могут ингибироваться соединениями, которые обратимо связываются с каталитическим центром, конкурируя таким образом с субстратом. Кроме того,

реагенты, необратимо модифицирующие другие участки белка, также могут вызывать инактивацию фермента. В условиях клетки подобные явления встречаются относительно редко. В физиологических условиях скорости многих ферментативных реакций регулируются в результате обратимого связывания ферментами реагентов, называемых *эффекторами*; это связывание осуществляется на специфических участках (не являющихся субстратсвязывающими), называемых *аллостерическими центрами*. В условиях постоянных концентраций фермента и субстрата связывание отрицательного эффектора снижает скорость реакции (*аллостерическое ингибирование*), связывание же положительного эффектора увеличивает ее (*аллостерическая активация*). Аллостерическое ингибирование может достигаться либо в результате уменьшения эффективности связывания фермента с субстратом, что проявляется в увеличении K_m , либо в результате уменьшения «числа оборотов» фермента, что проявляется в снижении V_{max} . Аллостерическая активация, напротив, сопровождается либо уменьшением K_m , либо увеличением V_{max} .

Если аллостерическим эффектором является сам субстрат, то говорят о *гомотропном аллостерическом эффекте*, если же эффектор не является субстратом — о *гетеротропном аллостерическом эффекте*. Некоторые ферменты имеют несколько аллостерических центров, одни из которых специфичны к положительным, а другие — к отрицательным эффекторам. Аллостерические центры аналогично субстратсвязывающим участкам активных центров могут проявлять различную специфичность при связывании эффекторов; она может быть либо абсолютной, т. е. проявляться только к одному определенному эффектору, либо относительной, т. е. проявляемой к группе сходных по структуре эффекторов. Наиболее важным является то обстоятельство, что все эффекторы, действующие *in vivo*, участвуют в нормальном метаболизме клетки, причем их эффективность является функцией их концентрации в клетке.

Все известные аллостерические ферменты состоят из двух (или более) субъединиц, которые имеют либо идентичную, либо различную последовательность аминокислот и содержат более одного субстратсвязывающего участка (на молекулу). Взаимодействие эффектора или субстрата с аллостерическим ферментом вызывает изменение конформации субъединиц, что приводит к изменению каталитических свойств фермента. Схематически конформационные изменения, которые могут происходить при связывании эффекторов с субъединицей, показаны на рис. 8.8. Изменение конформации одной из субъединиц (в результате связывания эффектора) может повлиять на конформацию второй субъединицы (не присоединившей эффектора) и изменить ее каталитическую активность (рис. 8.9).

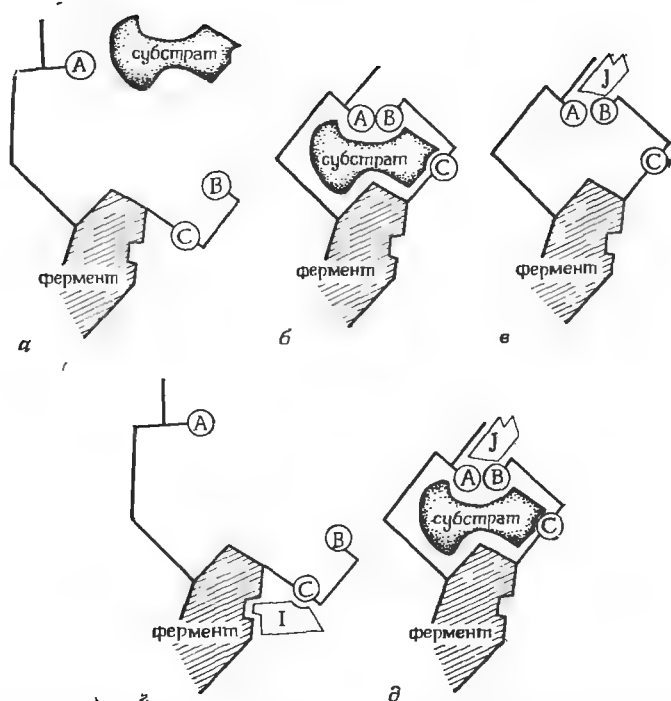


Рис. 8.8. Схема, показывающая индуцируемые лигандом конформационные изменения в белковом мономере. *а* — конформация белка до связывания лиганда; *б* — конформация белка после связывания субстрата, вызвавшего конформационное изменение, приводящее к тесному сближению каталитических групп А и В; *в* — активатор J индуцирует конформационное изменение, приводящее к тесному сближению каталитических групп в отсутствие субстрата; *г* — ингибитор I индуцирует конформационное изменение, удерживающее фрагмент пептидной цепи, содержащий группу В, в таком положении, при котором сходство субстрата к ферменту оказывается сильно уменьшенным; *д* — субстрат и активатор связаны с белком, находящимся в активной конформации. [Koshland D. E., p. 345, in P. Boyer, ed., *The Enzymes*, Vol. I, 3d ed., Academic Press, Inc., New York, 1970.]

Если известно, что фермент состоит из нескольких субъединиц, это еще не означает, что он является аллостерическим. Многие полисубъединичные ферменты, имеющие более одного активного центра, функционируют согласно кинетике Михаэлиса — Ментен [уравнение (10)], не имеют эффикторов, и каждый из активных центров функционирует автономно, т. е. его действие не зависит от того, в какой степени насыщены субстратом активные центры соседних субъединиц. Функционирование аллостерических ферментов характеризуется более сложной кинетикой (рис. 8.10). Зависимости V от $[S]$ часто имеют вид сигмоидных кривых, а графики

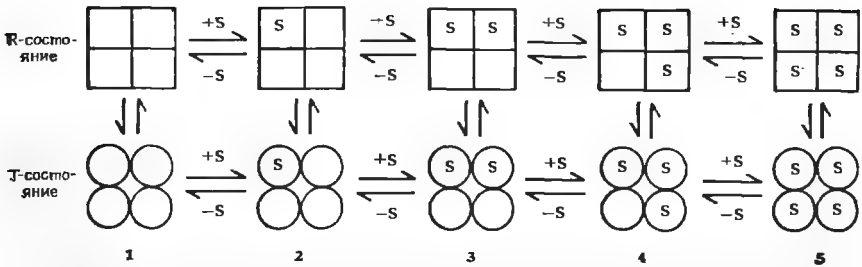


Рис. 8.9. Схема конформационных состояний аллостерического фермента и изменений конформации, индуцируемых эффектором S, который может либо являться, либо не являться субстратом. Квадрат или кружок обозначают одну из четырех субъединиц. Любое состояние находится в динамическом равновесии с другими состояниями; доля каждой из форм зависит от природы рассматриваемого конкретного фермента. Допустим, что фермент более активен в R-состоянии, чем в T-состоянии, что S — положительный эффектор и что равновесие между R- и T-состоянием (в отсутствие субстрата) значительно смещено в пользу T-состояния. При увеличении концентрации S будут преобладать состояния T1, T2, T3; однако равновесие между состояниями T3 и R4 смещено в пользу R4, поскольку индуцируемое эффектором изменение конформации повышает связывание субстрата с R4 и R5. Таким образом, наиболее вероятными являются следующие формы: T1, T2, T3, R3, R4 и R5.

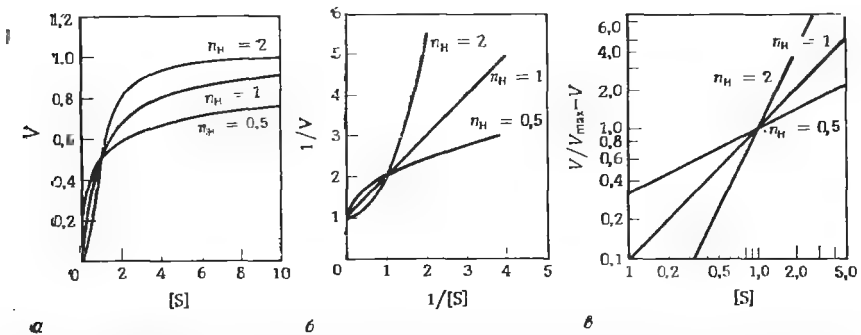


Рис. 8.10. Кинетика действия аллостерических ферментов. а — зависимость V от $[S]$; б — зависимость $1/V$ от $1/[S]$; в — график согласно уравнению (37). Приведены типы графиков при $n_H=1$ (кооперативность отсутствует), $n_H=2$ (положительная кооперативность) и $n_H=0,5$ (отрицательная кооперативность). Обратите внимание на то, что при $n_H=1$ на рис. а наблюдается сигмоидная зависимость. [Koshland D., p. 352, in P. Boyer, ed., *The Enzymes*, vol. I, 3d ed., Academic Press, Inc., New York, 1970.]

для их обратных величин оказываются нелинейными. Кинетика их действия описывается уравнением, подобным уравнению (9); сделав некоторые преобразования этого уравнения, получаем

$$K = [S]^{n_H} \frac{V_{\max} - V}{V} \quad (36)$$

или в логарифмической форме

$$\lg \frac{V}{V_{\max} - V} = n_H \lg [S] - \lg K \quad (37)$$

где n_H — единственный параметр, которым уравнения (36) и (37) отличаются от уравнения (9); это *коэффициент Хилла*, впервые введенный при описании нелинейных кривых насыщения гемоглобина кислородом (гл. 31). Численное значение n_H не может превышать n_m — максимального числа лигандов (эффекторов или субстратов), которое может связать белок (обычно оно равно числу субъединиц аллостерического фермента). Зависимость $\lg\{V/(V_{\max}-V)\}$ от $\lg[S]$ является прямой с наклоном n_H (рис. 8.10). n_H отражает характер аллостерических свойств фермента в присутствии эффекторов. Как схематически показано на рис. 8.9, при связывании эффектора или субстрата с одним из аллостерических центров происходит изменение конформации соседней субъединицы, приводящее к активации субстратного центра этой субъединицы; это изменение конформации является показателем *кооперативного взаимодействия* между каталитическими центрами фермента.

Положительная кооперативность характеризуется $n_H > 1$, т. е. связывание первой молекулы субстрата или эффектора усиливает связывание второй молекулы субстрата и наблюдается ускорение реакции. Это обстоятельство отражает график зависимости V от $[S]$ для пируваткиназы (рис. 8.11); положительными эффекторами фермента являются фосфоенолпируват (PEP) и фруктозо-1,6-дифосфат (FDP). График зависимости V от $[PEP]$ представляет собой гиперболу, в то время как соответствующая логарифмическая зависимость [уравнение (37)] при $[PEP] > \sim 0,25$ ммоль/л — прямая с наклоном 2 ($n_H = 2$). Следовательно, заполнение одного аллостерического центра PEP повышает каталитическую активность других центров по отношению к PEP. Более того, при постоянной $[PEP]$ увеличение концентрации другого эффектора FDP, который связывается с другими аллостерическими центрами, приводит к активации фермента по отношению к PEP как субстрату. Построение логарифмической зависимости дает $n_H = 1,98$; эта величина характеризует положительную кооперативность по FDP.

При *отрицательной кооперативности* эффекторы или субстраты понижают связывание последующих молекул субстрата с субстратными центрами или субъединицами аллостерического фермента, и в этом случае всегда $n_H < 1$ (рис. 8.10).

Хорошо изучен фермент аспартат-транскарбамоилаза (АТСаза) из *E. coli*; на примере структуры и функции этого фермента можно проиллюстрировать ряд свойств аллостерических фермен-

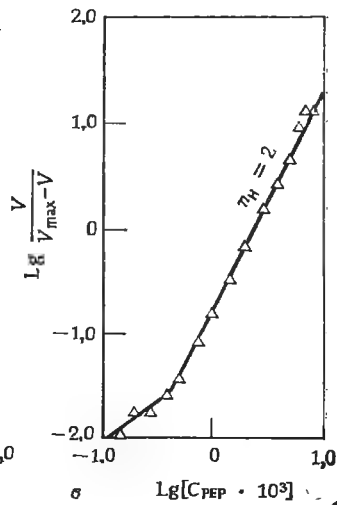
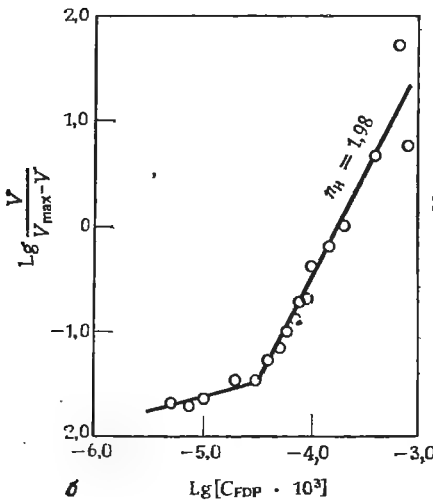
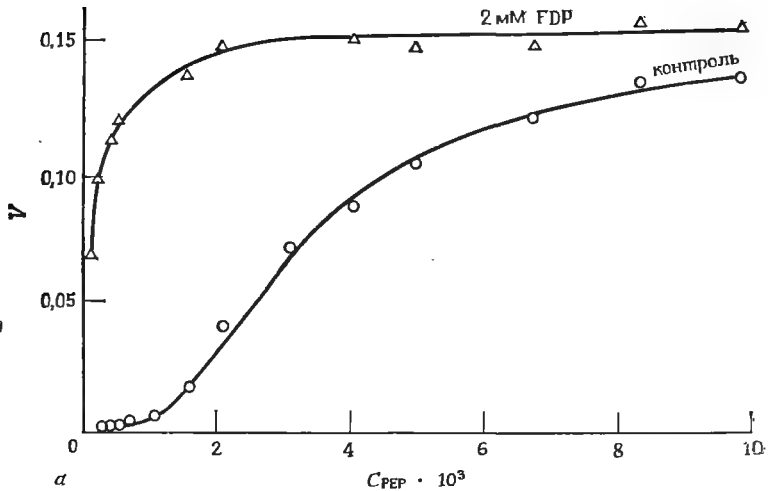
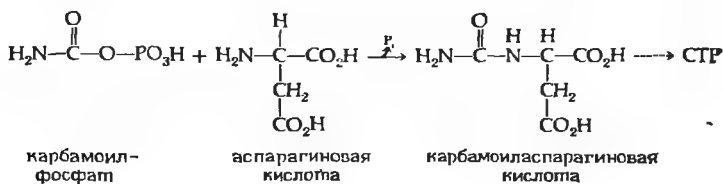


Рис. 8.11. Кинетический анализ действия дрожжевой пируваткиназы; видна положительная кооперативность при связывании фруктозо-1,6-дифосфата (FDP) (положительный эффектор) и субстрата фосфоенолпирувата (PEP). а — зависимость V от $[PEP]$ в присутствии и в отсутствии FDP. б и в — графики согласно уравнению (37), позволяющие определить n_H для FDP и PEP. [Gutfreund H., Enzymes: Physical Principles, Wiley — Intersciences, p. 85, New York, 1972.]

тов. АТСаза катализирует первую из шести стадий биосинтеза цитидинтрифосфата (СТР).



СТР — отрицательный эффектор АТСазы; следовательно, когда накапливается много СТР, происходит торможение образования карбамоилфосфата. Напротив, если концентрация СТР мала, образование карбамоилфосфата может ускоряться, увеличивая синтез СТР. АТР является положительным эффектором АТСазы, увеличивая (при высоких концентрациях) каталитическую активность фермента. Действие СТР на АТСазу является одним из многих примеров регуляции, когда конечный продукт метаболического пути, включающего ряд последовательных ферментативных реакций, может временно снижать скорость своего собственного синтеза. На примере рассматриваемой системы видно также, как одно из соединений (в данном случае АТР), участвующее в ряде метаболических процессов вместе с СТР, может влиять на синтез последнего. Такой тип метаболической регуляции на уровне ферментов обсуждается в гл. 11.

АТСаза (молекулярная масса 300 000) при блокировании ионами ртути Hg^{2+} тиоловых групп диссоциирует на субъединицы двух типов, как это схематически показано на рис. 8.12. Один тип субъединиц C_3 является тримером (молекулярная масса 99 000); тример обладает каталитической активностью и не чувствителен к действию СТР; в состав молекулы нативного фермента входят две C_3 -каталитические субъединицы. Каждый тример связывает сукцинат — нереакционноспособный аналог субстрата аспарата (молекула нативного фермента может связывать шесть молекул сукцината). Другой тип субъединиц R_2 является «активным» димером; в молекуле нативного фермента имеются три R_2 -регуляторные субъединицы (молекулярная масса 33 000). «Активный» димер связывает СТР, но не субстраты (молекула нативного фермента может связывать шесть молекул СТР). Для реконструкции нативного фермента необходимо освободить тиоловые группы (удалив Hg) и иметь в смеси субъединицы обоих типов. В нативном ферменте имеется шесть ионов Zn^{2+} , и они необходимы при реконструкции фермента из субъединиц. Сильные денатурирующие агенты вызывают диссоциацию активных C_3 - и R_2 -субъединиц на

неактивные мономерные субъединицы С (молекулярная масса 33 000) и R (молекулярная масса 17 000).

При диссоциации фермента в результате обработки солями Hg^{2+} каталитическая активность увеличивается примерно в четыре раза. График зависимости V от $[S]$ для C_3 -субъединицы имеет форму гиперболы (рис. 8.13, кривая 1), в то время как для нативного фермента такой график имеет сигмоидную форму и смещен вправо (кривая 2). В присутствии СТР график смещается ближе к оси абсцисс (кривая 3). В присутствии положительного эффектора АТР происходит вытеснение СТР; график рассматриваемой зависимости при этом смещается влево. Таким образом, АТР и СТР конкурируют за один и тот же регуляторный центр. Сигмоидный характер кривой для АТСаза в отсутствие СТР показывает, что

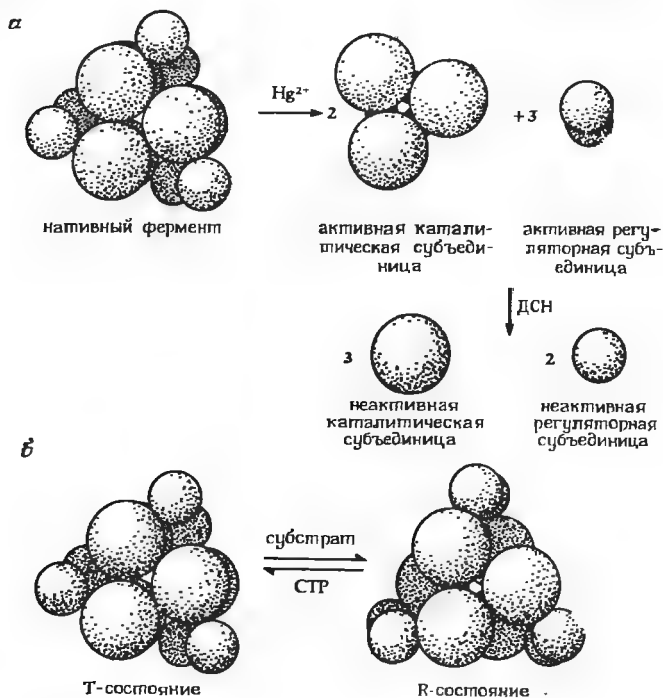


Рис. 8.12. а — Схематическая модель субъединичной структуры аспартат-транс-карбамоилазы, показывающая вызываемую добавлением соли ртути диссоциацию на каталитически активные тримерные субъединицы (молекулярная масса 99 000) и регуляторные димерные субъединицы (молекулярная масса 34 000); при обработке денатурирующими агентами, например додецилсульфатом натрия (ДСН), образуются неактивные мономерные С- и R- субъединицы. б — модели предполагаемых структур фермента в R (релаксированном)- и Т (компактном)-состояниях (см. рис. 8.9). Субстрат индуцирует R-состояние, а СТР — Т-состояние.

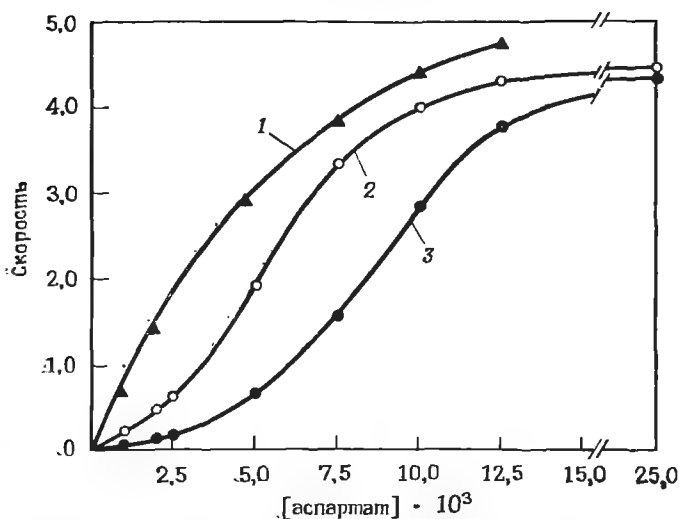


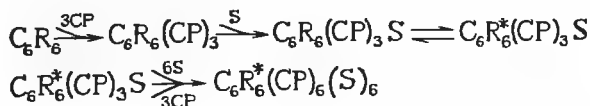
Рис. 8.13. Зависимость скорости реакции, катализируемой транскарбамоилазой, от концентрации субстрата. 1 — в присутствии солей ртути: функционирование фермента подчиняется обычной кинетике Михаэлиса и $n_H=1$; 2 — нативный фермент: $n_H>1$; 3 — в присутствии СТР: кривая сдвинута к абсциссе; K_m имеет более высокое значение, что отражает уменьшение сродства фермента к субстрату, т. е. для достижения той же самой скорости требуется более высокая концентрация аспартата.

$n_H>1$; отрицательный эффектор увеличивает K_m (т. е. требуются более высокие концентрации S для насыщения фермента).

Ряд данных позволяет полагать, что АТСаза может находиться в различных конформационных состояниях: в присутствии субстратов в *релаксированном* или *R-состоянии*, в то время как в присутствии СТР в *компактном* или *T-состоянии*. 32 тиоловые группы фермента реагируют с ионами Hg^{2+} в присутствии карбамоилфосфата и аспартата быстрее, чем в их отсутствие или в присутствии только одного из субстратов. СТР уменьшает скорость реакции Hg^{2+} с тиоловыми группами. Следовательно, в *R-состоянии* фермент имеет менее напряженную конформацию, при этом тиоловые группы оказываются более доступными для взаимодействия с реагентом. Кроме того, в присутствии карбамоилфосфата и сукцината коэффициент седimentации фермента оказывается примерно на 4% меньшим, чем в присутствии СТР. Поскольку в этих условиях не происходит диссоциации фермента, различие в значениях коэффициента седimentации позволяет считать, что в *R-состоянии* молекула фермента является более асимметричной и имеет более высокий коэффициент трения (разд. 5.2).

Нативная АТСаза в отсутствие сукцината связывает только три молекулы карбамоилфосфата, однако в присутствии сукцината

она связывает шесть молекул карбамоилфосфата; следовательно, АТСаза проявляет гомотропную положительную кооперативность.



где C_6R_6 обозначает 12 субъединиц нативного фермента, CP — карбамоилфосфат, S — сукцинат и C_6R_6^* — релаксированное состояние. Для связывания CP как в присутствии, так и в отсутствие сукцината $n_H=1$; связывание одной молекулы сукцината создает условия для полного насыщения фермента карбамоилфосфатом; связывание последующих молекул сукцината происходит кооперативно.

8.7.2. Активация ферментов в результате ковалентной модификации

В ряде случаев ферментативная активность изменяется в результате ковалентной модификации молекулы фермента. При процессах одного типа происходит активация неактивного предшественника фермента, *зимогена*, в результате действия протеолитических ферментов; при процессах другого типа осуществляется модификация одного фермента другим, приводящая к ковалентному присоединению к модифицируемому ферменту небольшой группы.

8.7.2.1. Активация зимогенов

Некоторые ферменты, которые функционируют вне клеток (в пищеварительном тракте или в плазме крови), синтезируются в виде зимогенов и активируются только после гидролиза одной или нескольких определенных пептидных связей. Примерами зимогенов являются *трипсиноген* и *химотрипсиноген*, которые синтезируются поджелудочной железой и секретируются в тонкий кишечник, где происходит их активация; в результате образуются *трипсин* и *химотрипсин*. Фермент кишечника *энтеропептидаза* гидролизует в трипсиногене одну пептидную связь лизил — изолейцил (между остатками 6 и 7); в результате освобождаются трипсин и гексапептид. На рис. 8.14 показаны серии реакций, которые приводят к активации химотрипсиногена. Гидролиз трипсином одной пептидной связи в химотрипсиногене приводит к образованию активного π -*химотрипсина*, который в результате аутогидролиза превращается в другую активную форму — δ -*химотрипсин*. Несовершенный, лишь частично преобразованный активный центр в химотрипсиногене при активации претерпевает неболь-

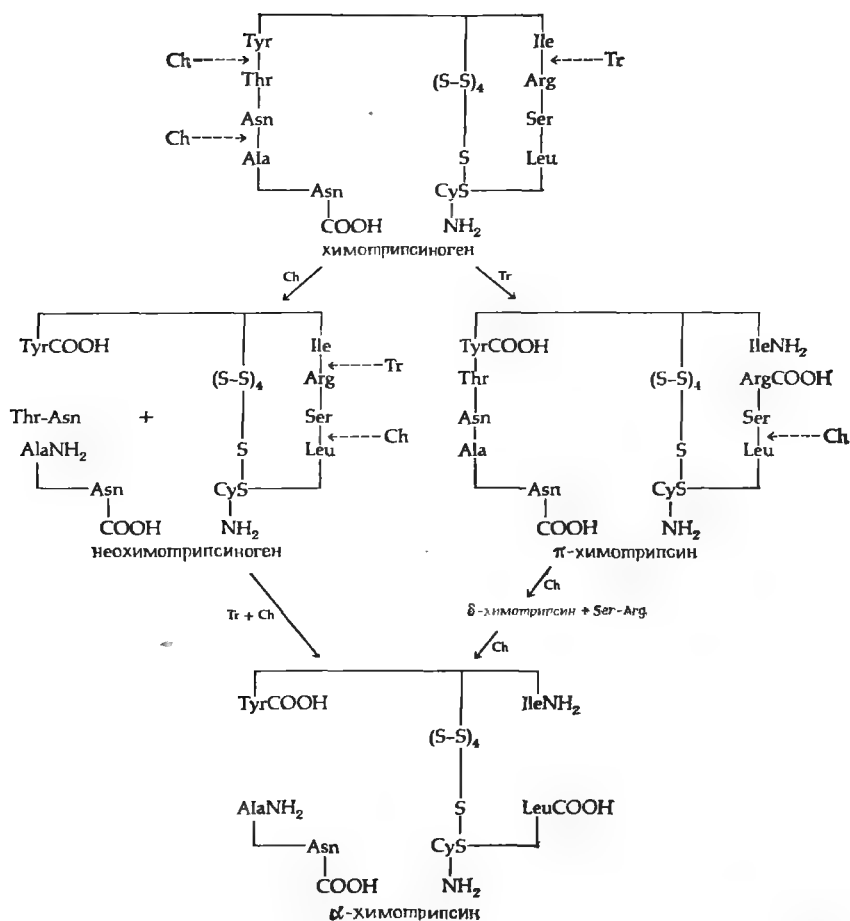


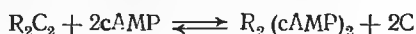
Рис. 8.14. Схема активации химотрипсиногена А. В результате гидролиза связи Arg—Ile образуется π-химотрипсин. Затем следует отщепление дипептида Ser—Arg, что приводит к образованию δ-химотрипсина; последний в результате освобождения дипептида Thr—Asn превращается в α-химотрипсин. При осуществлении другого пути активации вначале в качестве промежуточного продукта образуется неактивный неохимотрипсиноген. Далее при действии трипсина образуется активный π-химотрипсин. В то время как химотрипсиноген образован одной полипептидной цепью, химотрипсин построен из трех цепей, соединенных дисульфидными связями (условно обозначены на схеме). Tr — трипсин, Ch — химотрипсин (из работ Нейрата, Дежюэля и сотр.).

шие структурные изменения, в результате чего формируется активный центр химотрипсина.

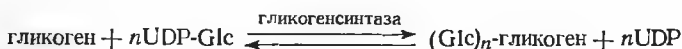
Активация зимогенов происходит также при осуществлении ряда тонко регулируемых процессов, например при свертывании крови (гл. 29) и связывании комплемента (гл. 30).

8.7.2.2. Регуляция активности ферментов путем ковалентной модификации

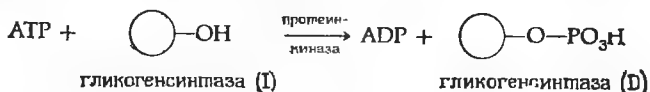
Ковалентная модификация ряда ферментов происходит не путем расщепления пептидных связей, а в результате ферментативной модификации, приводящей к присоединению специфической группы к молекуле модифицируемого фермента. Примером группы ферментов, которые осуществляют подобную модификацию, являются *протеинкиназы*, фосфорилирующие другие ферменты. Протеинкиназа скелетных мышц находится в форме неактивного холофермента (молекулярная масса 160 000), имеющего субъединичную структуру R_2C_2 , где R (молекулярная масса 48 000) — регуляторная субъединица, а C (молекулярная масса 38 000) — каталитическая субъединица. При наличии в среде небольших количеств 3',5'-циклического аденилата (сАМР) (гл. 10) фермент обратимо диссоциирует, как показано ниже:



Присоединение сАМР к R-субъединицам освобождает ранее прочно связанные C-субъединицы, которые могут далее катализировать фосфорилирование белков и других ферментов. Например, *гликогенсинтаза*, катализирующая следующую реакцию:



может находиться в двух формах: фосфорилированной и нефосфорилированной. Протеинкиназа фосфорилирует (при участии АТР) нефосфорилированную форму I фермента, переводя ее в фосфорилированную форму D, у которой фосфорилированы гидроксидные группы остатков серина.



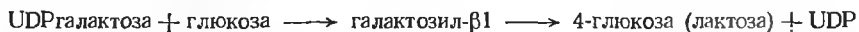
I-форма гликогенсинтазы более активна, чем D-форма, однако D-форма является аллостерическим ферментом, активируемым специфическим эффектом — глюкозо-6-фосфатом. Фосфорилирование и дефосфорилирование гликогенсинтазы играет ключевую роль в тонкой регуляции синтеза гликогена; фосфорилированные

и дефосфорилированные формы ряда других ферментов также имеют важное значение в деградации гликогена *гликогенфосфорилазой* (гл. 15).

В последующих главах встречаются и другие примеры ковалентной модификации регуляторных ферментов.

8.7.2.3. Регуляторный контроль, осуществляемый в результате белок-белковых взаимодействий

Регуляция скорости при функционировании аллостерических ферментов достигается в результате кооперативного взаимодействия между субъединицами. Некоторые ферменты, например такие, как *протеинкиназа*, вследствие определенных белок-белковых взаимодействий субъединиц находятся в неактивном состоянии. Другой пример участия белок-белковых взаимодействий в регуляции ферментативной активности встречается в случае *лактозосинтазы* — фермента, который функционирует на завершающей стадии синтеза лактозы в лактирующих молочных железах. Лактозосинтаза катализирует реакцию



Лактозосинтаза является, по существу, модифицированной *UDP-галактоза: N-ацетилглюкозамин-галактозилтрансферазой* — ферментом, который помимо молочной железы находится во многих тканях; этот фермент катализирует «надстройку» олигосахаридных простетических групп ряда гликопротеидов:



В секреторных клетках лактирующей железы связанная с мембраной галактозилтрансфераза взаимодействует с находящимся только в молоке растворимым белком *α -лактальбумином*, образуя лактозосинтазу, катализирующую синтез лактозы. В результате этого взаимодействия субстратная специфичность трансферазы так изменяется, что глюкоза становится субстратом-акцептором. Глюкоза является плохим акцептором (K_m от 1 до 2 моль/л) для исходной трансферазы, но становится хорошим субстратом-акцептором ($K_m \approx 10^{-3}$ моль/л) последней в присутствии *α -лактальбумина*.

См. литературу к гл. 9.

Глава 9

ФЕРМЕНТЫ. II

*Субстратная специфичность.
Увеличение скорости реакций.
Активный центр и механизм действия*

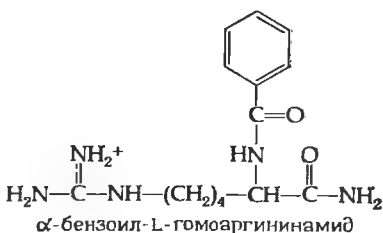
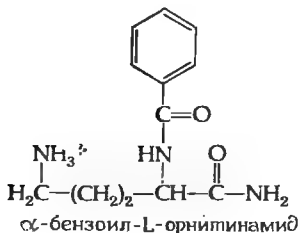
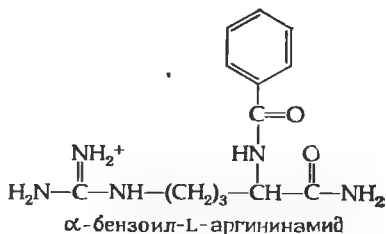
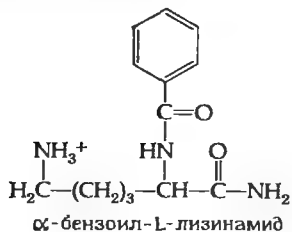
От обычных химических катализаторов ферменты отличаются высокой субстратной специфичностью и каталитической эффективностью. Большинство ферментов действует лишь на небольшое число «своих» природных субстратов, которые превращаются в определенные продукты с поразительно высокими выходами. Специфичность ферментов обусловлена уникальными структурами их активных центров, которые обеспечивают не только эффективное связывание определенных субстратов, но и исключают нежелательное связывание различных соединений, не являющихся субстратами. Между активным центром и субстратом осуществляется сильное взаимодействие благодаря нековалентным силам; можно считать, что действие ферментов объясняется именно «притягиванием» субстрата к активному центру, в котором субстрат претерпевает уникальные структурные превращения. Будучи высоко-специфичной, ферментативная реакция протекает в 10^6 — 10^{12} раз быстрее, чем спонтанная некатализируемая реакция в водном растворе.

В данной главе рассмотрены общие аспекты субстратной специфичности, предполагаемые механизмы, обеспечивающие значительное увеличение скоростей реакций, природа активных центров и механизмы действия некоторых ферментов, структурно-функциональные характеристики которых были изучены достаточно детально, что позволило постулировать весьма обоснованные механизмы. Поскольку перечисленные вопросы слишком обширны, иллюстрация общих принципов осуществляется с помощью только отдельных примеров. В то же время исключительно интересные химические превращения, осуществляемые при действии ферментов, неоднократно рассматриваются в последующих главах.

9.1. Субстратная специфичность ферментов

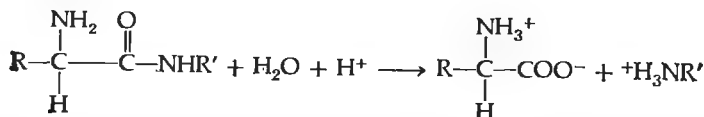
При изучении специфичности ферментов используют ряд соединений, структуры которых имеют определенные систематиче-

ские различия. Многие ферменты обладают *абсолютной специфичностью* к одному субстрату (и одному продукту). В качестве примеров можно привести *сукцинатдегидрогеназу* (разд. 8.5.1) и *фумаразу* (разд. 8.1.3), которые катализируют обратимые превращения сукцината в фумарат и фумарат в малат соответственно. Другие ферменты имеют менее узкую специфичность, например, *трипсин* гидролизует пептидные, амидные или эфирные связи, образованные лизином или аргинином (табл. 6.3). Модельными субстратами, характеризующими специфичность трипсина, являются α -N-бензоилпроизводные L-лизинамида, L-аргининамида, L-лизинэтилового эфира и L-аргининэтилового эфира, при гидролизе которых образуется α -N-бензоиламинокислота и либо аммиак, либо этанол. Однако ни α -N-бензоил-L-гомоаргининамид, ни α -N-бензоил-L-орнитинамид, структурно отличающиеся от α -N-бензоилпроизводных аргининамида и лизинамида только на одну метиленовую группу, не гидролизуются трипсином; это показывает, что рассматриваемый фермент обладает определенной степенью специфичности. В случае трипсина известно, что его специфичность обусловлена взаимодействием катионной группы субстрата с β -карбоксильной группой аспарагиновой кислоты фермента. Удаление катионной группы субстрата от атакующей связи на расстояние, соответствующее одной CH_2 -группе, не позволяет субстрату связаться надлежащим образом и препятствует ферментативному гидролизу.



Другие ферменты могут реагировать с различными соединениями и имеют, следовательно, *относительно широкую субстрат-*

ную специфичность. Примером является *лейцинаминопептидаза*, которая с различными скоростями гидролизует амиды многих аминокислот и дипептиды (табл. 9.1). Лейцинаминопептидаза катализирует реакцию



где R — боковая цепь аминокислоты, а R' — либо атом H (в амидах), либо другая аминокислота (в дипептидах). Субстрат должен иметь незамещенную аминогруппу и атом водорода у α-углерода, соседнего с атакуемой пептидной или амидной связью; N-концевой остаток должен иметь L-конфигурацию [за исключением глицина, производные которого являются, однако, плохими субстратами (см. табл. 9.1)].

Таблица 9.1

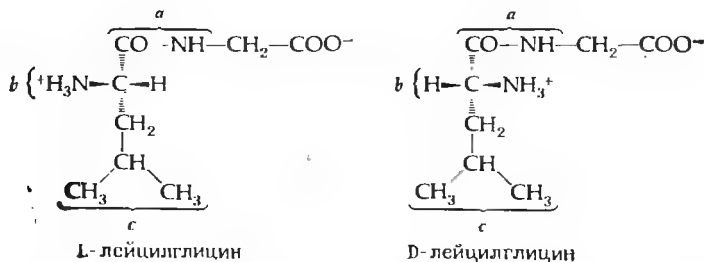
Относительные скорости гидролиза различных субстратов лейцинаминопептидазой^a

Субстрат	Относительная скорость	Субстрат	Относительная скорость
L-Лейцинамид	100	L-Лейцил-L-лейцин	100
L-Фенилаланинамид	26	L-Лейцил-L-изолейцин	64
L-Изолейцинамид	20	L-Лейцил-L-аланин	64
L-Гистидинамид	19	L-Лейцил-L-фенилаланин	26
L-Лизинамид	7,1	L-Аланил-L-лейцин	93
L-Аланинамид	3,4	L-Аланилглицин	9,4
L-Аспарагиновой кислоты диамид	2,9	Глицил-L-лейцин	10
L-Серинамид	0,8	Глицилглицин	1,1
L-Пролинамид	0,7	D-Лейцилглицин	0
Глицинамид	0,1	Ацетил-L-тирозинамид	0
D-Лейцинамид	0	α-Бензоил-L-аргининамид	0
β-Аланинамид	0		

^a Скорость для лейцинамида условно принята за 100, для остальных субстратов приведены относительные скорости. Фермент выделен из почек свиньи; определения проведены с ферментом, активированным Mn^{2+} при pH 8,0–8,5. [Delange R. L., Smith E. Z., p. 81, in: P. Boyer, ed., *Enzymes*, vol. III, Academic Press, Inc., 1971.]

Рассмотренные выше примеры иллюстрируют ряд аспектов субстратной специфичности ферментов. При взаимодействии суб-

страта и активного центра имеет место *пространственная, или стерическая, специфичность*. Это положение было сформулировано в 1935 г. Бергманом и сотр., которые, объясняя способность лейцинаминопептидазы гидролизовать L-лейцилглицин, по не D-лейцилглицин (табл. 9.1), убедительно полагали, что взаимодействие фермента с субстратом должно осуществляться по крайней мере в трех точках. Это поясняется на приводимой ниже схеме:



Если *a*, *b* и *c* — участки активного центра фермента, комплементарные указанным группам L-лейцилглицина, и если приведенная пространственная ориентация необходима для связывания и последующего катализа, то очевидно, что невозможно *ориентировать в пространстве* те же самые три группы D-лейцилглицина, чтобы они взаимодействовали с участками *a*, *b* и *c*. Эта концепция *полиаффиности* была подтверждена относительно недавно кристаллографическим анализом фермент-ингибиторных комплексов; ее иллюстрацией может служить также стереоспецифичность трипсина и фумаразы. Скорость превращения субстрата зависит от размера и строения групп субстрата; об этом свидетельствуют не только неспособность соединений, содержащих D-аминокислоты, служить субстратами лейцинаминопептидазы, но также и различие в скоростях гидролиза амидов лейцина и изолейцина. Столь же впечатляющей является неспособность трипсина гидролизовать α-N-бензоилпроизводные L-орнитинамида и L-гомоаргининамида.

Связывание субстратов с комплементарными участками активного центра осуществляется за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий и водородных связей; однако некоторые ферменты образуют ковалентные интермедиаты (такие примеры встречаются далее). Скорость гидролиза амидов (табл. 9.1) лейцинаминопептидазой зависит от природы R-группы: она увеличивается в последовательности $\text{H} < \text{CH}_3 < \text{C}_2\text{H}_5 < \text{C}_3\text{H}_7 < \text{C}_4\text{H}_9$. Наличие в R-группе полярных или ионных структур, таких, как $-\text{COO}^-$, $-\text{NH}_3^+$, $-\text{CONH}_2$ и $-\text{CH}_2\text{OH}$, снижает скорость гидролиза. Основываясь на этом, можно предположить, что между R-группой суб-

страта и комплементарной гидрофобной областью активного центра осуществляется гидрофобное взаимодействие. Такие представления подтверждаются данными о том, что алифатические спирты являются ингибиторами фермента (по-видимому, в результате конкуренции с R-группами субстрата за взаимодействие с гидрофобной зоной активного центра). В связывании субстратов участвуют также и электростатические взаимодействия; на это, в частности, указывают данные о том, что эфиры фумарата и малата не являются субстратами фумаразы. Другой пример — неспособность сукцинатдегидрогеназы действовать на замещенный по одной из карбоксильных групп сукцинат или фумарат (например, на монометилловый эфир сукцината). Это находится в согласии с данными о том, что конкурентные ингибиторы дегидрогеназы содержат по крайней мере одну карбоксилатную группу и что наиболее эффективными ингибиторами являются соединения с двумя незамещенными карбоксилатными группами (разд. 8.5.1). Положительный заряд на ϵ -аминогруппе лизина или гуанидиновой группе аргинина необходим для субстратов трипсина; кристаллографические исследования показывают, что R-группы субстрата локализируются в активном центре таким образом, что катионные аминокислоты и гуанидиновая группа оказываются в непосредственной близости от анионной карбоксилатной группы боковой цепи остатка аспарагиновой кислоты фермента. Наиболее убедительные свидетельства множественности взаимодействий, осуществляемых между ферментом и субстратом, получены при сравнении структур ферментов и их комплексов с ингибиторами (по данным кристаллографических исследований); эти данные обсуждаются ниже в этой главе.

9.2. Механизмы увеличения скоростей катализируемых ферментами реакций

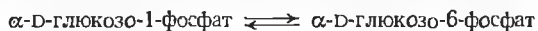
Один из главных вопросов биохимии заключается в следующем: каким образом ферменты ускоряют химическую реакцию? Многие факторы ответственны за такое ускорение, которое, как обсуждалось выше (разд. 8.1.6), является в конечном счете результатом снижения энергии активации катализируемых реакций.

9.2.1. Увеличение скорости и субстратная специфичность

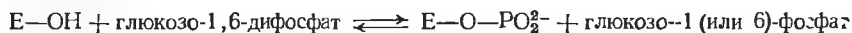
Для различных типов химических реакций, катализируемых ферментами, известны аналогичные реакции в органической химии. Однако уникальным свойством ферментов является их субстратная специфичность. Характер действия многих ферментов

указывает на то, что специфическая энергия многоточечного связывания, осуществляемого между комплементарными группами субстрата и активного центра, используется в качестве движущей силы катализа и вносит значительный вклад в снижение энергии активации процесса, т. е. приводит к значительному его ускорению. Значение специфичности отчетливо проявляется при сравнении скоростей гидролиза ряда субстратов лейцинаминопептидазой (табл. 9.1). Эффективность гидролиза субстрата зависит в первую очередь от гидрофобности R-группы N-концевой аминокислоты, которая участвует в образовании атакуемой амидной или пептидной связи.

Другим примером может служить действие *фосфоглюкомутазы* (гл. 15), которая катализирует обратимую реакцию



Эта реакция протекает только в присутствии Mg^{2+} и глюкозо-1,6-дифосфата; в ходе реакции образуется промежуточное соединение — фосфорилфермент, фосфатная группа которого (связанная с определенным остатком серина в молекуле фермента) обменивается с фосфатными остатками субстрата и глюкозо-1,6-дифосфата:



В результате этой реакции происходит взаимопревращение фосфатных эфиров. Фосфорилфермент стабилен в водных растворах, но реагирует с различными соединениями типа RON (табл. 9.2) согласно реакции



Сравнение скоростей фосфорилирования различных субстратов позволило выяснить ряд интересных аспектов, характеризующих связывание субстрата и каталитическую эффективность. Перенос фосфорильной группы с фермента на воду (гидролиз фосфорилфермента) протекает очень медленно, со скоростью лишь в ~ 60 раз большей, чем скорость неферментативного гидролиза серинфосфата. В то же время фосфит и ксилозо-1-фосфат, не являющиеся субстратами, ускоряют перенос фосфата фосфорилфермента на воду в 580 и $1,7 \cdot 10^5$ раз соответственно. Это показывает, что реакционность фосфорильной группы фосфорилфермента значительно увеличивается в присутствии соединений, структурно сходных с субстратами и способных, следовательно, связываться с активным центром (фосфит связывается на участке фосфата, а ксилоза — на участке сахара). Ксилоза фосфорилируется фосфорилферментом значительно быстрее, чем вода; в присутствии же фосфита она фосфорилируется с образованием ксилозо-1-фосфата в $2 \cdot 10^9$ раз быстрее, чем вода; наблюдаемая скорость лишь в

Таблица 9.2

Относительные скорости фосфорилирования ряда соединений
фосфорилферментом (фосфоглюкомутазой)^a

Субстрат ROH	Относительная скорость ^a	Субстрат ROH	Относительная скорость ^a
HOH	1		$2 \cdot 10^5$
	580		$4,4 \cdot 10^5$
	$1,7 \cdot 10^5$		$1,4 \cdot 10^6$
α -D-ксилозо-1-фосфат			$4,4 \cdot 10^7$
	$7 \cdot 10^4$		$9 \cdot 10^5$
D-ксилоза			$3 \cdot 10^{10}$
	$2 \cdot 10^9$	α -D-глюкозо-1-фосфат	
D-ксилоза			

^a Скорость фосфорилирования воды условно принята равной единице, для остальных соединений приведены относительные скорости. Константа скорости первого порядка фосфорилирования воды фосфорилферментом при 30 °C и pH 7.5 равна $3,2 \cdot 10^{-8}$ с⁻¹. [Jencks W. R., Adv. Enzymol., 43, 219, 1975.]

15 раз меньше скорости фосфорилирования природного субстрата — глюкозо-1-фосфата. Наконец, ряд ациклических монофосфодиолов, у которых между гидроксидной и фосфорильной группами находятся еще четыре атома, фосфорилируется ферментом со скоростями в 10^5 — 10^7 раз большими, чем скорость фосфорилирования воды. Таким образом, связывание соединений, обладающих соответствующими структурами, с фосфатным и сахарным участками активного центра приводит к значительному снижению энергии активации реакций фосфорилирования, осуществляемых фосфоглюкомутазой. Данные табл. 9.2 убедительно свидетельствуют в пользу представления о том, что сильные взаимодействия, обуславливающие связывание субстрата с активным центром, влияют

также на характер химических процессов, что приводит к чрезвычайно большому ускорению превращения субстрата.

Имея в виду изложенные выше представления, можно перейти теперь к рассмотрению различных механизмов, которые, как полагают, обеспечивают увеличение скоростей реакций, катализируемых ферментами; эти механизмы учитывают энергию взаимодействия фермента с субстратом, проявляющуюся в субстратной специфичности фермента.

9.2.2. Индуцированное соответствие и ферментативный катализ

Предполагается, что многие ферменты в отсутствие субстратов находятся в неактивном состоянии и что функциональные группы их активных центров не ориентированы в пространстве надлежащим образом для взаимодействия с комплементарными группами субстрата. Однако при связывании специфического субстрата происходит такое конформационное изменение фермента и, следовательно, его активного центра, в результате которого соответствующие R-группы центра занимают необходимое для взаимодействия с субстратом положение; это обеспечивает осуществление каталитического процесса. Такие индуцированные субстратом конформационные изменения называют *индуцированным соответствием*; его иллюстрирует схема, приведенная на рис. 8.8. Убедительные данные, свидетельствующие о конформационных изменениях при связывании субстрата, основаны главным образом на сравнении структур фермента, полученных методом рентгено-структурного анализа, в присутствии и в отсутствие ингибиторов. В качестве примера можно указать на соответствующие данные для карбоксипептидазы (разд. 9.3.4) и лизоцима (разд. 9.3.3). Кроме того, ряд свойств ферментов, находящихся в растворенном состоянии, указывает на различие их конформации в присутствии и в отсутствие субстратов. Например, некоторые ферменты в присутствии субстратов утрачивают способность взаимодействовать со специфическими антителами; многие ферменты в присутствии специфических субстратов оказываются более стабильными в отношении тепловой денатурации, у них изменяются показатели оптического вращения, они перестают диссоциировать на субъединицы; у некоторых ферментов изменяются седиментационные характеристики. Принято считать, что в результате индуцированного соответствия может увеличиваться скорость некоторых ферментативных реакций; однако обусловленное этим механизмом увеличение скорости, вероятно, относительно невелико по сравнению с соответствующими эффектами, обусловленными другими механизмами.

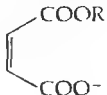
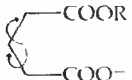
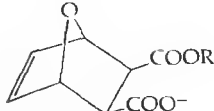
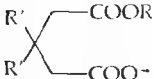
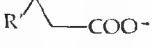
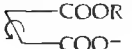
9.2.3. Эффект приближения

Наиболее вероятный механизм, благодаря которому фермент может увеличивать скорость бимолекулярной реакции, состоит в том, что в активном центре субстраты настолько приближаются друг к другу (в надлежащей ориентации), что их эффективные концентрации оказываются значительно большими, чем в разбавленном растворе. По существу это крайне маловероятное состояние, однако благодаря сильным и множественным взаимодействиям между субстратом и структурами активного центра ферменты увеличивают вероятность сближения двух субстратов и эффективно превращают бимолекулярную реакцию в мономолекулярную внутримолекулярную реакцию. Для этого эффекта предложен ряд названий (ориентация, близость, сближение, орбитальное взаимодействие и др.); в данном разделе используется термин *приближение*.

Эффект приближения весьма убедительно иллюстрируют модельные интрамолекулярные реакции, в которых отчетливо проявляется влияние структуры соединений на скорости реакций. В табл. 9.3 приведены структуры *n*-бромфениловых эфиров янтарной и глутаровой кислот (в форме карбоксилат-ионов) и относительные скорости их гидролиза (в сопоставлении со скоростью бимолекулярной катализируемой ацетатом реакции гидролиза

Таблица 9.3

Структуры и относительные скорости гидролиза анионов монофениловых эфиров дикарбоновых кислот^a

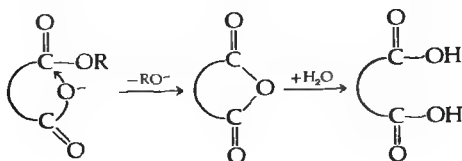
Структура ^б	Относительная скорость гидролиза	Структура ^б	Относительная скорость гидролиза
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CH}_3\text{COOR}$	1,0		$1 \cdot 10^2$
	$\sim 1 \cdot 10^4$		$\sim 5 \cdot 10^7$
	$3 \cdot 10^{18}$		
	$1,3 \cdot 10^{16}$		
	$\sim 2,2 \cdot 10^3$		

^a Bruice T. C., Ann. Rev. Biochem., 45, 331, 1976.

^б R = *n*-Br-C₆H₄-.

^в Скорость зависит от R'.

n-бромфенилацетата). Каждый из эфиров гидролизуется в результате внутримолекулярной нуклеофильной атаки соседним карбоксилатным ионом согласно следующей реакции:

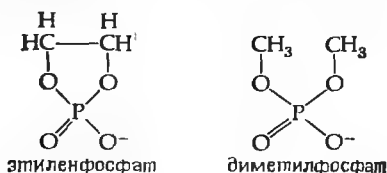


В случае эфиров с более «жесткой» структурой увеличивается вероятность необходимой ориентации и эффективного приближения атакующей карбоксилатной группы к эфирной связи, поэтому они расщепляются быстрее, чем соединения с большей свободой вращения (с менее «жесткой» структурой). У многих из приведенных соединений связи оказываются напряженными, и их можно рассматривать как пружины, упругость которых несколько изменяется в переходном состоянии. На основании приведенных данных было рассчитано, что *эффективные концентрации* карбоксилатных групп около эфирных групп могут достигать очень высоких значений (10^5 — 10^8 моль/л). Это физически нереальные концентрации; однако с их помощью можно проиллюстрировать преимущества внутримолекулярных реакций по сравнению с межмолекулярными и возможности значительного ускорения процесса в активном центре в результате приближения реагирующих групп. По имеющимся оценкам, в результате эффекта приближения реакция может ускоряться в 10^8 раз; учитывая также ускорения, обеспечиваемые другими механизмами, можно объяснить те высокие скорости, которые наблюдаются в случае ферментативных реакций.

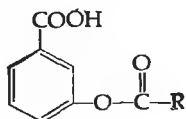
9.2.4. Дестабилизация

Согласно относительно старой гипотезе о механизме ферментативного катализа, в субстрате при взаимодействии с поверхностью фермента индуцируется напряжение (деформация или дестабилизация) разрываемой связи; при этом предполагается, что в промежуточном соединении или комплексе разрываемая связь оказывается менее стабильной, чем в исходном субстрате. Эффект напряжения можно проиллюстрировать путем сопоставления скоростей катализируемого основанием гидролиза этилен-

фосфата и диметилфосфата; первое соединение гидролизуется в 10^7 раз быстрее, чем второе.

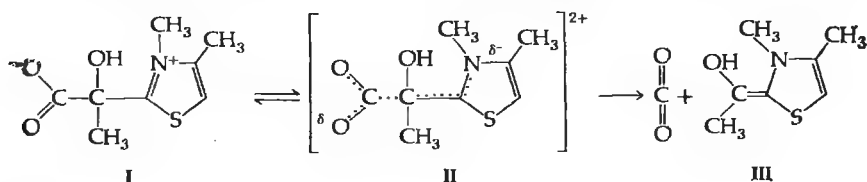


Гипотеза напряжения представляется весьма вероятной в случае ферментативного катализа. Интересным примером может служить действие эстеразы печени лошади. При изучении гидролиза серии эфиров *м*-оксибензойной кислоты



обнаружено, что увеличение длины цепи R почти не влияет на K_m , в то время как $V_{\max}$ увеличивается на несколько порядков. Поскольку гидролизуемая связь остается одной и той же, по-видимому, увеличение энергии связывания в случае длинноцепочечных эфиров уменьшает энергию активации реакции, т. е. энергия связывания углеводородного фрагмента индуцирует напряжение в зоне гидролизуемой связи. Известны и другие случаи дестабилизации субстрата при взаимодействии с ферментом; одним из наиболее интересных примеров является связывание субстратов лизоцимом (разд. 9.3.3).

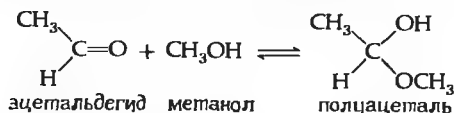
Дестабилизация может происходить также при десольватировании заряженного субстрата; перенос субстрата из водной среды в относительно гидрофобную среду активного центра может способствовать значительному увеличению скорости. В качестве модельной реакции, иллюстрирующей влияние десольватирования, можно привести декарбоксилирование аддукта пирувата с аналогом тиаминопирофосфата (гл. 12), протекающее следующим путем:



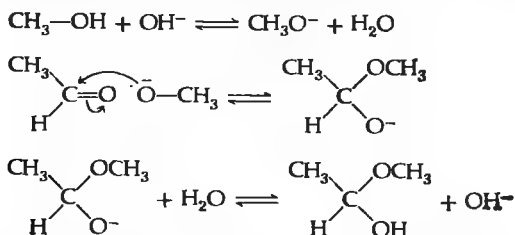
Аддукт I медленно декарбоксилируется в воде; однако в этаноле декарбоксилирование происходит в 10^4 — 10^5 раз быстрее (освобождаются CO_2 и III). В диметилсульфоксиде декарбоксилирование происходит еще быстрее; при внесении I в этот растворитель наблюдается даже вспенивание раствора. Полагают, что увеличение скорости декарбоксилирования является результатом делокализации заряда в структуре II (предполагаемое переходное состояние) по сравнению с аддуктом I. Имеются данные о том, что такого рода механизм увеличения скорости может осуществляться при функционировании *пируватдекарбоксилазы* (гл. 14), поскольку связанный с ферментом тиаминпирофосфат (кофактор) локализован, по-видимому, в относительно гидрофобной области фермента.

9.2.5. Согласованный общий кислотно-основной катализ

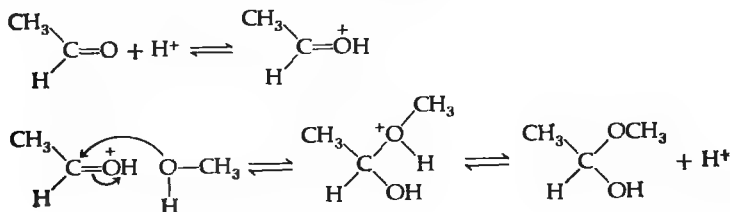
В органической химии известно много реакций, катализируемых кислотами или основаниями. Так, например, образование полуацеталей катализируется либо кислотами, либо основаниями.



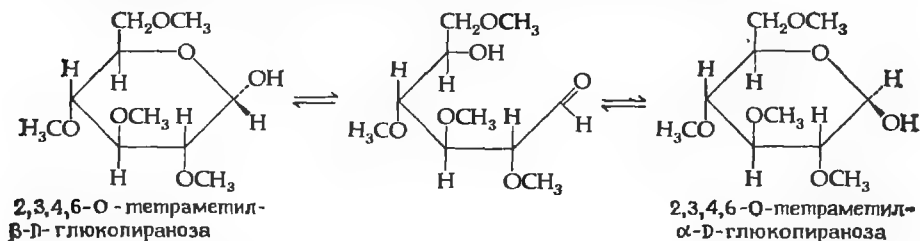
Основание OH^- ускоряет образование полуацетала следующим путем:



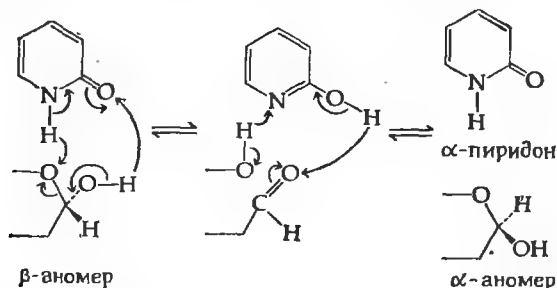
В ходе кислотного катализа происходит образование оксониевой соли, которая реагирует далее со спиртом:



Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что многие группы в активных центрах ферментов могут функционировать как общие кислотные или общие основные катализаторы и тем самым вносить вклад в увеличение скорости процесса. Особенно эффективным является согласованный общий кислотно-основной катализ; модельной реакцией, иллюстрирующей этот тип катализа, является мутаротация (разд. 2.2.2) тетраметилглюкозы:



Кислоты и основания ускоряют мутаротацию; если любой из аномеров растворить в бензоле и добавить смесь фенола и пиридина, то мутаротация происходит очень быстро. Изучение кинетики реакции показывает, что скорость процесса зависит от концентраций фенола, пиридина, а также тетраметилглюкозы; это позволяет сделать вывод, что фенол и пиридин действуют совместно как кислотный и основной катализаторы. Далее установлено, что если функциональные группы фенола (кислотную) и пиридина (основную) ввести в одну молекулу, как это имеет место в случае α -пиридола (α -оксипиридина), то образуется значительно более эффективный катализатор, хотя каталитические группы в α -пиридоне являются существенно менее сильными, чем в феноле и пиридине, по своим кислотным и основным свойствам. Полагают, что катализ мутаротации α -пиридоном протекает следующим образом:



При раскрытии пиранозного кольца β -аномера интермедиат получает протон от атома азота (кислота), а карбонильный кислород (основание) акцептирует протон. Далее при замыкании кольца с

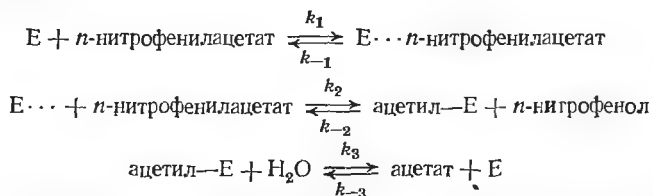
образованием α -аномера атом азота акцептирует протон от интермедиата (с раскрытым кольцом), а фенольный гидроксил поставляет протон. Установлено, что такой согласованный общий кислотно-основной катализ осуществляется при функционировании ряда ферментов, в частности рибонуклеазы (разд. 9.3.2). Маловероятно, что в результате катализа такого типа скорость реакции увеличивается более чем в 10—100 раз, однако наряду с другими механизмами он может вносить определенный вклад в увеличение скорости ферментативных реакций.

Многие аминокислоты могут функционировать в качестве общих кислотно-основных катализаторов в активных центрах ферментов; к числу таких аминокислот относятся глутаминовая и аспарагиновая кислоты, гистидин, лизин, тирозин и цистеин. В протонированной форме они являются кислотными катализаторами, а в непротонированной форме — основными катализаторами (разд. 5.2). Очевидно, что каталитическая эффективность R-групп этих аминокислот зависит от pK соответствующей функциональной группы и от pH , при котором протекает ферментативная реакция.

9.2.6. Ковалентный катализ

Некоторые ферменты, образующие ковалентные фермент-субстратные интермедиаты, перечислены в табл. 9.4, где указаны также группы ферментов, которые подвергаются ковалентной модификации, и характер структуры ковалентного интермедиата.

Одним из первых ферментов, для которого было показано образование ковалентного фермент-субстратного интермедиата, является химотрипсин; при действии этого фермента на *n*-нитрофенилацетат происходит быстрое освобождение *n*-нитрофенола и последующее значительно более медленное освобождение ацетата. Наблюдаемую кинетику процесса удалось объяснить, когда был выделен и охарактеризован ацилферментный интермедиат, устойчивый при низких pH . Установлено, что ацетилирование происходит по гидроксидной группе серина-195 фермента. Таким образом, гидролиз *n*-нитрофенилацетата протекает по крайней мере в три стадии:



Первой стадией является образование комплекса Михаэлиса, второй — ацилирование, приводящее к образованию ковалентного ин-

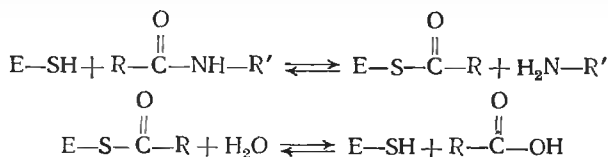
Таблица 9.4

Некоторые ферменты, образующие ковалентные фермент-субстратные интермедиаты

Группа ферментов	Реагирующая группа	Тип ковалентного интермедиата
1. Химотрипсин, трипсин, субтилизин, эластаза, тромбин, ацетилхолин-эстераза, плазмин	$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}$ серин	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}$ эфир карбоновой кислоты
2. Фосфоглюкомутаза, щелочная фосфатаза	$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}$ серин	$\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}(\text{O}^-)-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}$ эфир фосфорной кислоты
3. Папаин, фицин, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа	$\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}$ цистеин	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}$ тиоэфир карбоновой кислоты
4. Сукцинаттиокиназа, глюкозо-6-фосфатаза	$\text{HN} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{CH}_2-\text{CH}$ гистидин	$\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}(\text{O}^-)-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array} \text{CH}_2-\text{CH}$ фосфорилимндазол
5. Альдолаза, трансальдолаза, пиридоксальфосфатзависимые ферменты	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}$ лизин	$\text{R}-\overset{\text{R}}{\underset{\text{C}}{\parallel}}=\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}$ шиффово основание

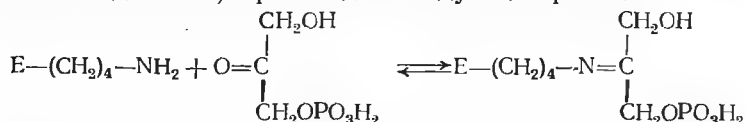
термедиата и освобождению первого продукта, и третьей — гидролиз интермедиата и освобождение второго продукта.

У протеолитических ферментов *папаина* и *фицина* в образовании ковалентного интермедиата (с фрагментом субстрата) участвует тиоловая группа цистеина, при взаимодействии которой с карбоксильной группой расщепляемой пептидной связи образуется тиоловый эфир; процесс гидролиза протекает по следующей схеме:

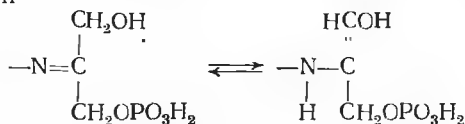


Другой тиоловый фермент — *глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа* (гл. 14), катализирующий окисление альдегидного субстрата, глицеральдегид-3-фосфата, образует «богатый энергией» тиоловый эфир (по SH-группе активного центра). Образовавшийся ковалентный ацилтиоэфир подвергается фосфоролизу, давая ацилфосфат, который сохраняет энергию ацилтиоэфирной связи ковалентного интермедиата.

Другой формой ковалентного связывания субстратов является образование шиффовых оснований (альдиминов) между карбонильными соединениями (субстратами) и ϵ -аминогруппой лизина, находящегося в активных центрах ряда ферментов. Так, при инкубации диоксиацетонфосфата с *альдолазой* (гл. 14) в отсутствие глицеральдегид-3-фосфата (обычного партнера в реакции, катализируемой альдолазой) происходит следующая реакция:



Образование ковалентного соединения было доказано путем восстановления альдиминной двойной связи и последующего полного кислотного гидролиза модифицированного фермента. В гидролизате был обнаружен модифицированный лизин; его ϵ -аминогруппа была связана (в форме вторичного амина) с углеродным скелетом диоксиацетонфосфата. Подобные же результаты получены и с другим ферментом — *трансальдолазой* (гл. 14). Образованием шиффова основания можно объяснить наблюдаемую в фосфодиоксиацетоне лабильность водорода у углерода, соседнего с карбонильной группой



В этой связи представляет интерес рассмотрение функций пиридоксальфосфата в аминотрансферазах, механизм действия которых обсуждается детально в гл. 20. Следует только отметить, что альдегидная группа пиридоксальфосфата, участвующая в переносе аминогруппы, образует шиффово основание с ϵ -аминогруппой лизина апофермента. Это не только способ связывания пиридоксальфосфата с ферментом (связывание осуществляется и другими участками молекулы пиридоксальфосфата), но прежде всего путь ускорения ферментативной реакции, поскольку процесс *трансальдиминирования* является значительно более быстрым по сравнению с процессом образования шиффова основания. Схема полуреакции ферментативного *переалминирования* приведена на рис. 9.1.

Важным преимуществом механизмов, включающих стадию образования ковалентных субстрат-ферментных интермедиатов, является избирательное увеличение вероятности протекания определенной реакции. Ковалентно связанный интермедиат обладает лишь весьма ограниченной подвижностью в активном центре фермента и может, следовательно, занимать более благоприятное положение для завершающей реакции с соответствующими группами активного центра. Кроме того, при функционировании ряда ферментов, таких, как глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и сукцинат-тиокиназа, при образовании продукта используется энергия ковалентного интермедиата. Увеличение скорости реакции в результате образования ковалентных интермедиатов может быть весьма значительным (как, например, для *альдолазы* и *трансаминазы*), однако в других случаях фактор ускорения не превышает 10^2 — 10^3 .

9.3. Природа активных центров и механизм действия ферментов

Для идентификации функциональных групп активных центров, установления характера взаимодействия между субстратом и фер-

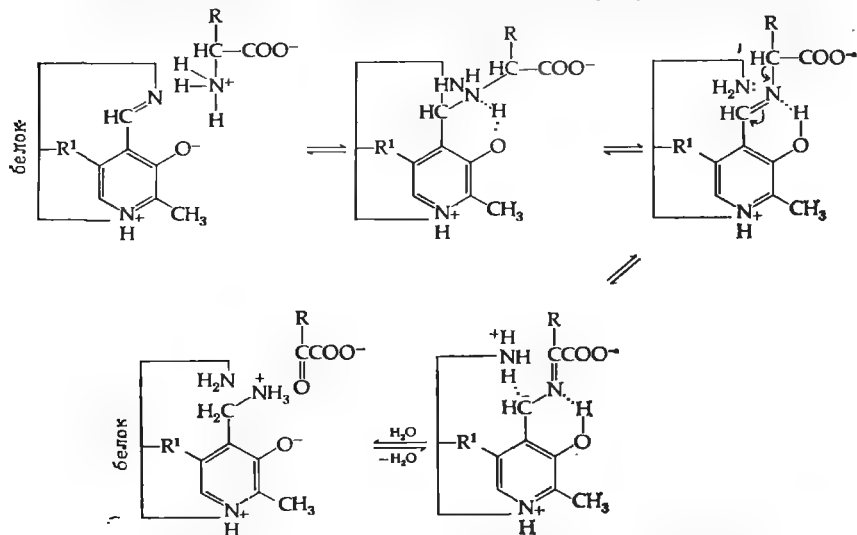


Рис. 9.1. Предполагаемая схема катализа полуреакции ферментативного переаминирования: альдиминная структура, не участвующая в образовании водородных связей, осуществляет взаимодействие с аминокислотой — субстратом, а освобождающаяся ε-аминогруппа лизина может функционировать в качестве кислотно-основного катализатора процесса переноса электронов, инициируемого пиридоксальем. [Snell E. E., Brookhaven Symp. Biol. 15, p. 39, Brookhaven National Laboratory, Upton., N. Y., 1962.]

ментом, а также вероятного механизма действия фермента используют различные экспериментальные подходы. Очевидно, что значительную информацию дает сравнение полной трехмерной структуры фермента в отсутствие и в присутствии ингибиторов. Такая информация может быть получена только на основании совокупности данных рентгеноструктурного анализа и полного определения аминокислотной последовательности; подобную информацию для ряда ферментов получить весьма нелегко. Для всесторонней интерпретации данных о структурах, полученных кристаллографическими методами, часто оказывается необходимым использовать другие экспериментальные подходы. Значительную информацию о ферменте и механизме его действия дает исследование субстратной специфичности и природы ингибиторов, а также кинетический анализ зависимости каталитической активности от pH, температуры и состава раствора. Существенным дополнением служит также изучение влияния на активность фермента действия химических реагентов, которые ковалентно модифицируют специфические R-группы фермента, или протеолитических ферментов, специфически расщепляющих одну или несколько пептидных связей.

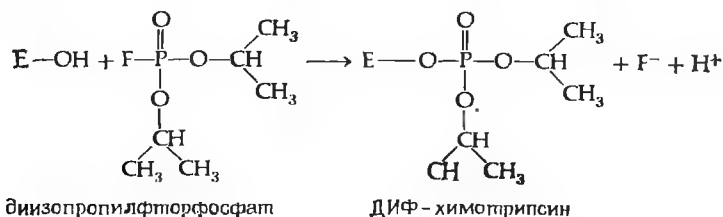
Ниже будут рассмотрены четыре различных гидролитических фермента (*химотрипсин, рибонуклеаза, лизоцим и карбоксипептидаза А*); их изучение может служить примером использования различных экспериментальных подходов с целью выяснения структурно-функциональных особенностей ферментов. Для каждого из этих ферментов установлена первичная структура, выяснена структура активного центра и механизм связывания субстрата. Кроме того, детально изучены каталитические свойства этих ферментов, и на основе полученных данных предсказан вероятный механизм действия каждого из них.

9.3.1. Химотрипсин

Лучшие субстраты и ингибиторы химотрипсина содержат ароматические или объемистые алифатические R-группы (табл. 6.3); это указывает на участие гидрофобных сил в образовании фермент-субстратного комплекса. Например, α -N-ацетилпроизводные L-тирозинамида и L-фенилаланинамида являются значительно лучшими субстратами, чем соответствующий амид L-аланина. Кинетические исследования (разд. 9.2.6) указывают также на образование ковалентного промежуточного соединения. Зависимость от pH константы скорости k_2 (разд. 9.2.6) позволяет предполагать, что в реакции ацилирования участвует группа с pK, близким к pK имидазольной группы боковой цепи гистидина.

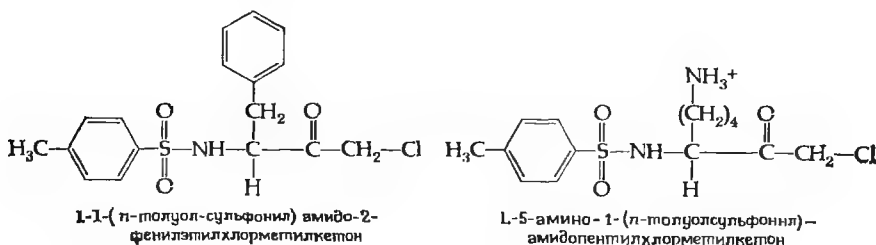
Химическая модификация специфическими реагентами указывает на функционирование в активном центре остатков серина и

гистидина. Ряд фторфосфатов инактивирует фермент; например, диизопропилфторфосфат (ДИФФ) стехиометрически реагирует с ферментом, образуя диизопропилфосфорилхимотрипсин (ДИФ-химотрипсин):

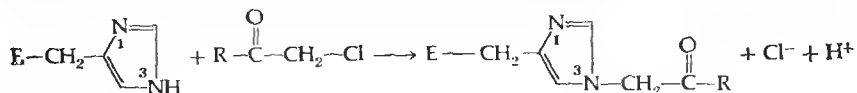


ДИФ-химотрипсин совершенно не активен. Поскольку из 28 остатков серина с реагентом взаимодействует только один остаток (серин-195), а утративший активность в результате тепловой денатурации химотрипсин вообще не модифицируется реагентом, сделано заключение, что серин-195 находится в активном центре. Все так называемые сериновые протеиназы (табл. 6.4), образующие промежуточные ковалентные соединения (ацилферменты), также реагируют с ДИФФ; анализ последовательности аминокислот в инактивированных с помощью ДИФФ ферментах показал, что остаток реактивного серина находится во фрагменте, имеющем у всех этих ферментов идентичную (или очень сходную) последовательность. Одна и та же последовательность Gly—Asp—Ser·P—Gly—Gly—Pro имеется в химотрипсине, трипсине, эластазе, тромбине и плазмине, однако у субтилизина последовательность аминокислот, включающая реактивный остаток серина, другая. Высокая реакционная способность модифицируемых остатков серина является следствием их уникального окружения в активных центрах соответствующих ферментов.

При действии на химотрипсин L-1-(*n*-толуолсульфонил)амидо-2-фенилэтилхлорметилкетона (ТФХК) также наблюдается включение ковалентно связывающегося ингибитора (параллельно происходит снижение активности)



Структура ТФХК отвечает требованиям, предъявляемым к хорошему субстрату, и напоминает амид или эфир ацетилфенилаланина, у которых $-\text{NH}_2$ или $-\text{OCH}_3$ заменены негидролизуемой группой $-\text{CH}_2-\text{Cl}$. Энергия связывания ТФХК (его сродство к активному центру) примерно такая же, как у субстрата, однако вследствие высокой реакционной способности группы $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2\text{Cl}$ реагирует с нуклеофилом в активном центре. Структурные исследования показывают, что ТФХК реагирует с азотом, находящимся в положении 3 имидазольного кольца гистидина-57:



где $\text{R} = 1-(n\text{-толуолсульфонил})\text{амидо-2-фенилэтил}$. У химотрипсина (а также у трипсина, тромбина и эластазы) His-57 находится в последовательности $\text{Ala}-\text{Ala}-\text{His}-\text{Cys}$.

На избирательную специфичность ТФХК к химотрипсину указывает тот факт, что ингибитор не реагирует с другой сериновой протеиназой — трипсином, однако трипсин реагирует со сходным ингибитором — 1-5-амино-1-(n -толуолсульфонил)амидопентилхлорметилкетон (ТАХК), в структуре которого имеется боковая цепь $-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_3^+$, необходимая для продуктивного связывания с активным центром трипсина. ТАХК модифицирует специфический остаток гистидина в трипсине, но не инактивирует химотрипсин. Обработка фермента ТФХК или ТАХК является примером *аффинной модификации* активного центра, а сами ингибиторы — *аффинными метками*, или, образно говоря, ингибиторами типа «троянского коня». Аффинные метки известны также для ряда других ферментов; они особенно полезны для идентификации остатков, находящихся в активном центре.

Известна последовательность (рис. 9.2) и пространственная структура α -химотрипсина и его зимогена — химотрипсиногена; частично сформированный в зимогене активный центр, не способный осуществлять катализ, полностью сформирован в химотрипсине, образующемся при активации зимогена (разд. 8.7.2.1). На рис. 9.3 изображена конформация пептидной цепи фермента; показано расположение групп активного центра. Остатки Ser-195 и His-57 сближены, что согласуется с более ранними данными по химической модификации групп активного центра. Данные рентгеноструктурного анализа свидетельствуют также об участии ряда других функциональных групп в формировании активного центра. N-Концевой изолейтин В-цепи, который не является концевым в одиночной полипептидной цепи неактивного зимогена и освобож-

геометрия их взаимного расположения позволяют образоваться между ними водородной связи. Далее, атом азота в положении 1 имидазольного кольца находится на расстоянии $\sim 2,8$ Å от атома кислорода карбоксилатной группы боковой цепи Asp-102; в этом случае геометрия взаиморасположения также благоприятна для образования водородной связи. Наконец, водородная связь образуется между одним из атомов карбоксилатной группы Asp-102 и —NH-группой пептидной связи, находящейся между His-57 и Ala-56. Три рассматриваемые остатка Asp-194, Ser-195 и Asp-102 образуют систему *переноса заряда*, которая, как полагают, с одной стороны, позволяет His-57 функционировать в качестве сильного кислотно-основного катализатора, а с другой стороны, способствуя оттягиванию протона от —ОН-группы Ser-195, увеличивает ее реакционную способность.

Сравнение кристаллических структур α -химотрипсина в присутствии и в отсутствие N-формилтриптофана (который называют *виртуальным субстратом*, поскольку кислород его карбоксильной группы обменивается с кислородом воды в присутствии химотрип-

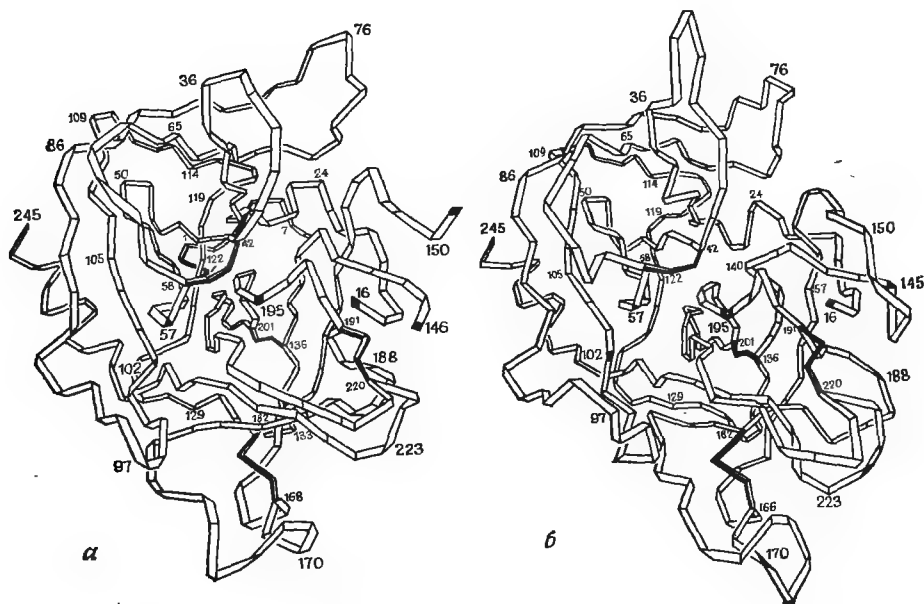


Рис. 9.3. Конформация пептидных цепей α -химотрипсина (а) и эластазы (б). Перегибы цепи соответствуют положениям α -углеродных атомов; R-группы не показаны. [Hartley B. S., Shotton D. M., p. 323, in: P. Boyer, ed., The Enzymes, vol. III, Academic Press, Inc., New York, 1971.]

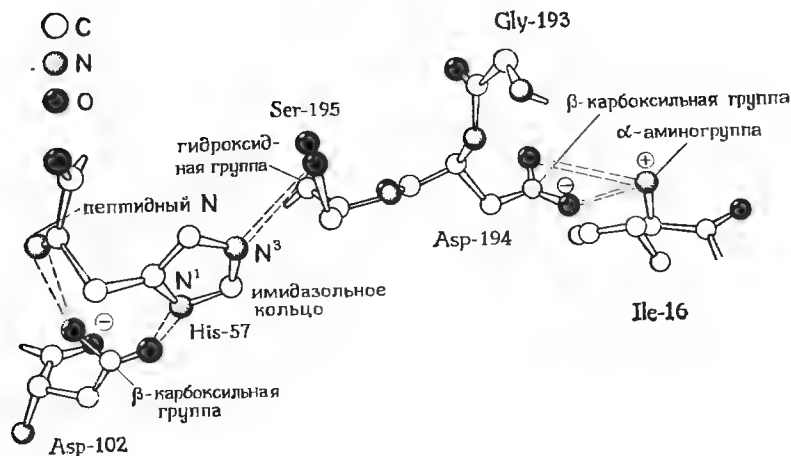
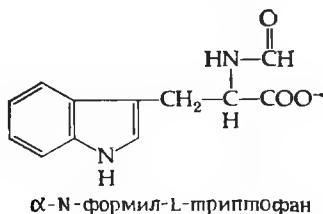


Рис. 9.4. Система переноса заряда в активном центре химотрипсина (по данным рентгеноструктурного анализа). [Blow D. M., p. 185, in: P. Boyer, ed., *The Enzymes*, vol. III, Academic Press, Inc., New York, 1971.]

сина) раскрывает некоторые дополнительные детали строения активного центра.



Как показано на рис. 9.5, N-формилтриптофан внедряется в «полость» активного центра и располагается очень близко от системы переноса заряда, с которой контактирует его карбоксильная группа. Индольная группа направлена в противоположную сторону, ее плоское кольцо располагается почти параллельно полипептидной цепи, проходящей вдоль обеих сторон кольца, и имеет гидрофобные контакты с некоторыми R-группами, в первую очередь с R-группой остатка Met-192. Амидная группа формилтриптофана направлена в сторону —CO-группы пептидной связи, образованной остатком Ser-214. Рассмотренные нековалентные взаимодействия, обеспечивают связывание субстрата, определяют специфичность химотрипсина и вносят вклад в увеличение скорости катализируемой реакции.

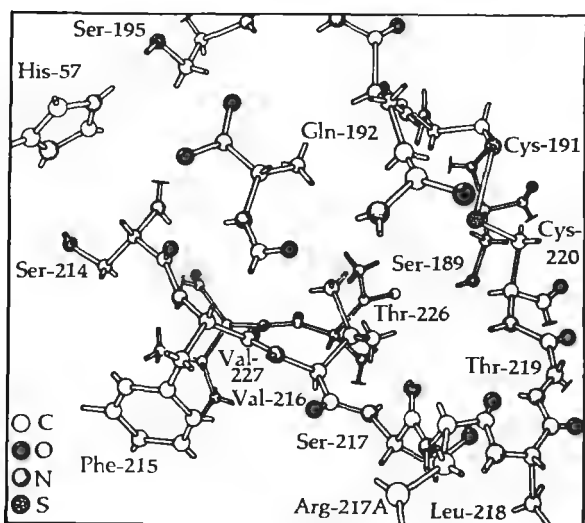
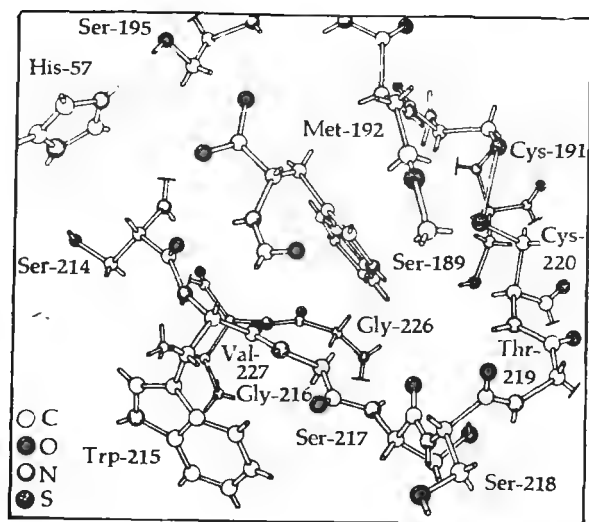


Рис. 9.5. Структуры активных центров α -химотрипсина (сверху) и эластазы (снизу), основанные на данных кристаллографического анализа; показано расположение виртуальных субстратов N-формилтриптофана (для α -химотрипсина) и N-формилаланина (для эластазы). [Hartley B. S., Shotten D. M., p. 323, in: P. Boyer, ed., *The Enzymes*, vol. III, Academic Press, Inc., New York, 1971.]

Вероятный механизм функционирования химотрипсина, основывающийся на приведенных выше данных, показан на рис. 9.6. Очевидно, что для решения вопроса, справедлив ли этот механизм, необходимы дальнейшие исследования. Однако этот механизм достаточно хорошо согласуется со всей доступной в настоящее время информацией.

В заключение следует отметить, что другие сериновые протеиназы, такие, как *плазмин*, *эластаза*, *тромбин* и *трипсин*, функционируют, по-видимому, по такому же механизму; эти протеиназы отличаются от химотрипсина некоторыми деталями структуры, которые, в частности, определяют различия в субстратной специфичности. Например, аминокислотная последовательность и конформация эластазы и химотрипсина очень сходны (рис. 9.3); эластаза также имеет систему переноса заряда, образованную такими же, как в химотрипсине, аминокислотными остатками. Особенности субстратной специфичности обнаруживаются в различном характере связывания виртуальных субстратов, как это видно на рис. 9.5. Сходные структурные и функциональные характеристики представителей рассматриваемого класса ферментов отражают их

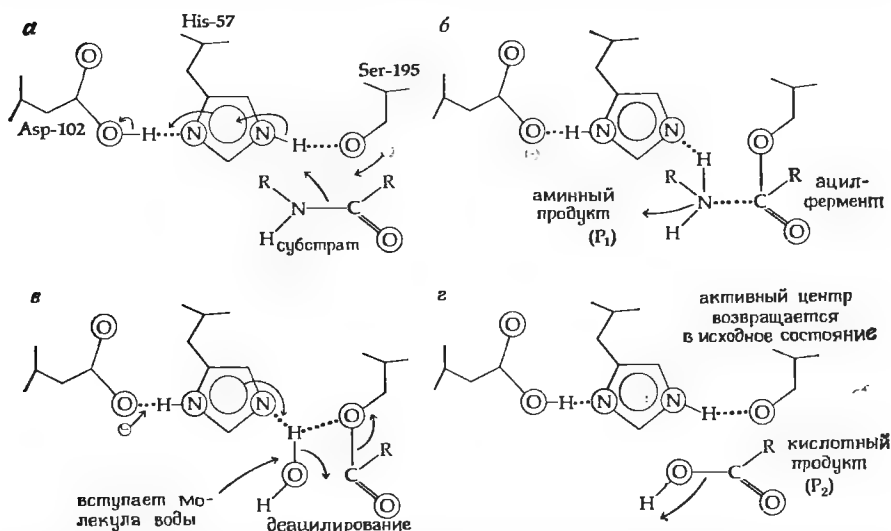


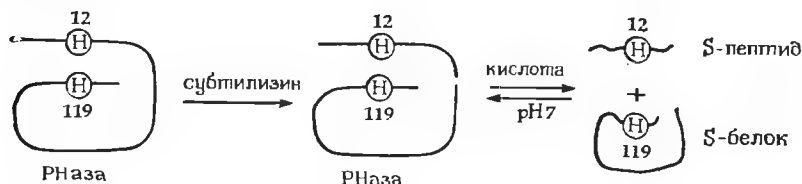
Рис. 9.6. Предполагаемая последовательность стадий при катализе, осуществляемом химотрипсином и родственными ему сериновыми протеиназами. В каталитическом центре функционирует система переноса заряда (а), включающая аспарагиновую кислоту, гистидин, серин, которые связаны водородными связями. Аннион (гидроксидной группы серина) осуществляет нуклеофильную атаку углерода рвщепляемой пептидной связи субстрата; образуется ацилфермент и освобождается аминный продукт (б). Гидролиз ацилфермента (в) возвращает активный центр в исходное состояние (г).

общее генетическое происхождение (гл. 27). Природа, однако, использовала такой же тип каталитического центра (система переноса заряда) у другого протеолитического фермента — *субтилизина*, который функционально сходен с химотрипсином, однако имеет совершенно другую последовательность аминокислот и другую конформацию. Тем не менее аминокислотная последовательность субтилизина позволяет полипептидной цепи свернуться таким образом, что образуется система переноса заряда, геометрически подобная соответствующей системе в химотрипсине (рис. 9.4).

9.3.2. Рибонуклеаза

Бычья панкреатическая *рибонуклеаза*, как было рассмотрено выше (разд. 7.3.1), гидролизует РНК; ее аминокислотная последовательность приведена на рис. 9.7. Еще до установления трехмерной структуры фермента, когда была известна только его аминокислотная последовательность, серия интересных исследований позволила получить значительную информацию об активном центре и механизме действия рибонуклеазы.

В определенных условиях *субтилизин* гидролизует в рибонуклеазе одну пептидную связь, находящуюся между 20-м и 21-м остатками. Фрагмент, содержащий остатки с 1-го по 20-й (S-пептид), остается в комплексе с крупным пептидным фрагментом, содержащим остатки с 21-го по 124-й (S-белок); расщепленный фермент сохраняет активность. После отделения S-пептида от S-белка путем фракционирования при кислом pH ни S-пептид, ни S-белок не обнаруживают активности. Если же смешать S-пептид и S-белок при pH 7,0, то они образуют активный комплекс — РНазу-S. S-Пептид связывается с S-белком не дисульфидными связями, а благодаря сильным нековалентным взаимодействиям. Рассмотренные данные отражены на приводимой ниже схеме; в кружке показаны остатки гистидина-12 и гистидина-119:



Синтетический пептид, идентичный по последовательности фрагменту S-пептида, содержащему остатки с 1-го по 13-й, способен взаимодействовать с S-белком; при этом восстанавливается ~70% активности РНазы-S; однако пептид, являющийся более коротким фрагментом S-пептида (остатки с 1-го по 11-й), не вос-

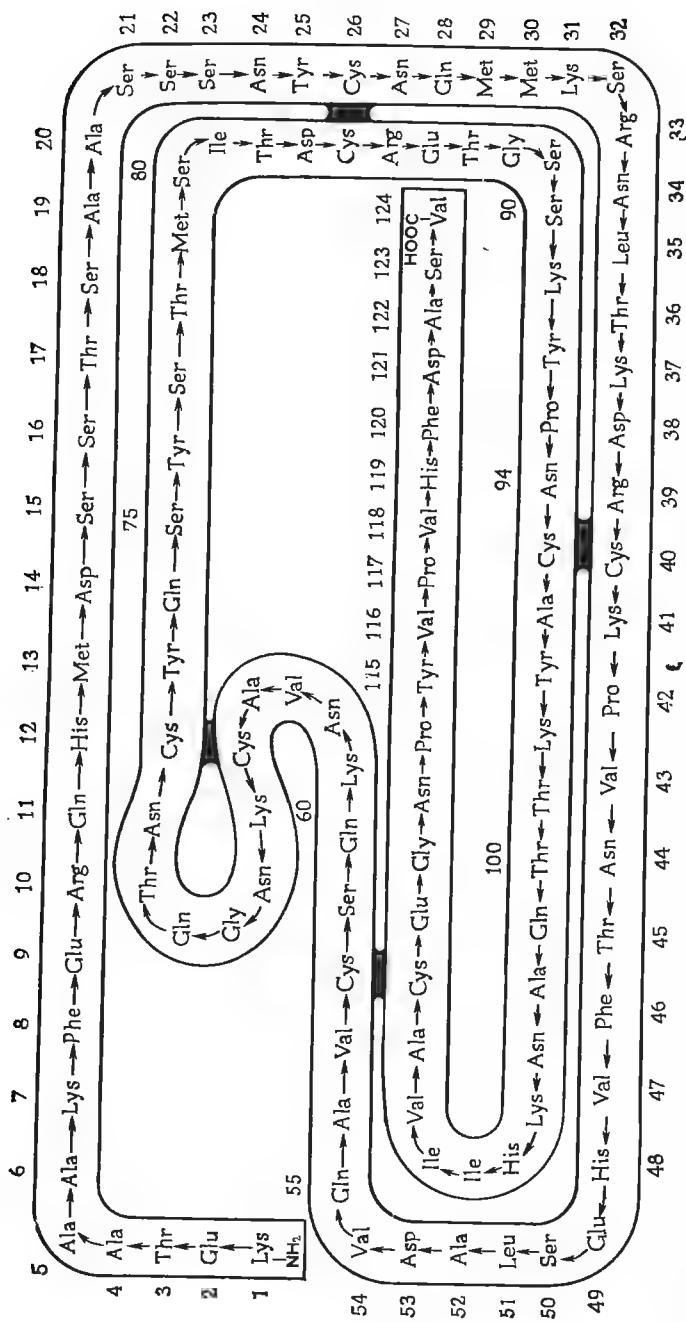
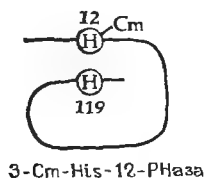


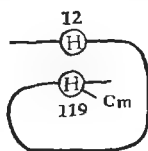
Рис. 9.7. Аминокислотная последовательность бычьей панкреатической рибонуклеазы. [Smyth D. G., Stein W. H., Moore S., J. Biol. Chem., 238, 227, 1963.]

становливают активности. Эти данные показывают, что либо His-12, либо Met-13, либо оба эти остатка играют ключевую роль в РНазной активности, в то же время остатки с 14-го по 20-й непосредственно не участвуют в формировании активного центра. Получены данные о важной роли ряда других остатков для активности фермента. Пепсин расщепляет пептидную связь между 120-м и 121-м остатками; фермент, лишенный остатков 121—124, оказывается неактивным. Если отщепить карбоксипептидазой А от S-белка Val-124, то после рекомбинации с S-пептидом активность РНазы-S полностью восстанавливается; при удалении Ser-123 и последующей рекомбинации активность снижается на 55%; при более глубоком действии карбоксипептидазы А, приводящем к отщеплению нескольких следующих остатков, включая Phe-120, наступает полная инактивация.

О важности для активности фермента His-12 и его функционировании в активном центре фермента свидетельствуют результаты карбоксиметилирования РНазы иодацетатом (ИА) при рН 5,5, т. е. в условиях, при которых преимущественно происходит карбоксиметилирование гистидина. Степень инактивации РНазы оказывается пропорциональной степени карбоксиметилирования; полностью лишенный активности фермент содержит только одну карбоксиметильную группу (на молекулу РНазы). При ионообменной хроматографии карбоксиметилированной РНазы обнаруживают две химически различные формы фермента; одна из них (выход ~15%) названа 1-См-His-119-РНазой (См=карбоксиметил), а другая (выход ~85%) 3-См-His-12-РНазой. Обе формы являются неактивными; при этом важно отметить, что ни одна из форм не содержит двух модифицированных остатков гистидина. Различные структуры обеих форм схематически изображено ниже:

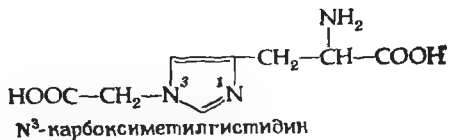
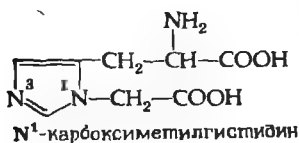


3-См-His-12-РНАза

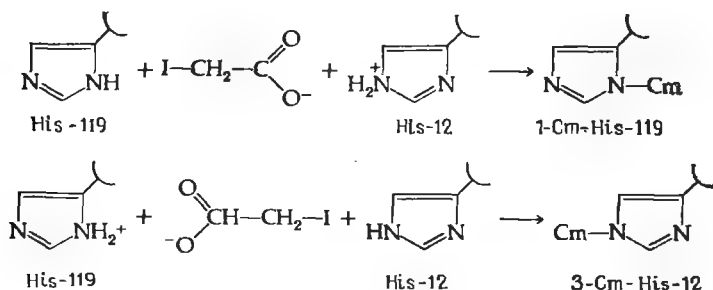


1-См-His-119-РНАза

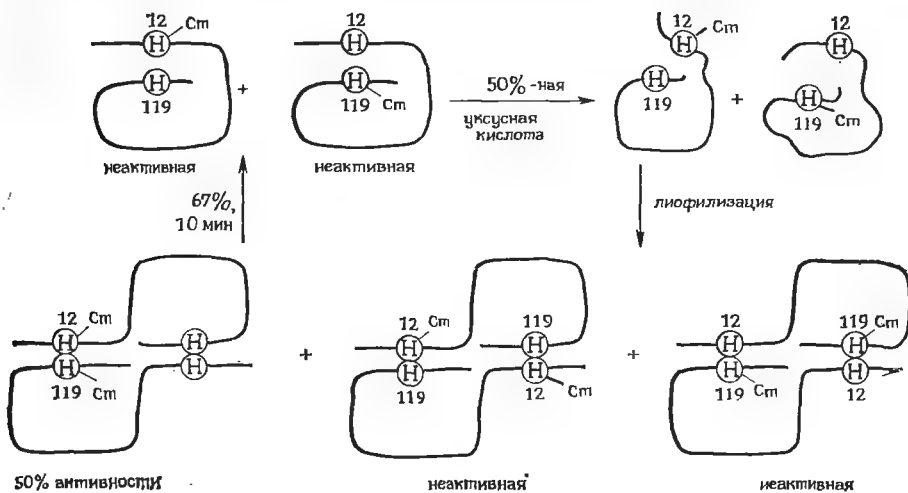
Анализ показал, что в 3-См-His-12-РНазе His-12 карбоксиметилирован по атому азота в положении 3, а в 1-См-His-119-РНазе His-119 — по атому азота в положении 1.



Следует отметить, что при дальнейшем действии ИА на обе монокарбоксиметилированные формы РНАзы алкилирования незамещенного гистидина не происходит. Эти данные показывают, что остатки гистидина выступают как нуклеофилы, вытесняя реакционноспособный атом иода ИА, что приводит к образованию карбоксиметилированных производных гистидина. Полученные данные позволяли также предполагать, что His-12 и His-119 сближены в активном центре, при этом His-119 способствует алкилированию His-12, а His-12 — алкилированию His-119.



Таким образом, алкилирование осуществляется благодаря надлежащей ориентации гистидинов, соответствующему расстоянию между ними, а также вследствие электростатического взаимодействия между заряженными имидазольными группами и карбоксилатной группой ИА. То обстоятельство, что His-119 алкилируется в большей степени, чем His-12, свидетельствует о более высоком значении pK имидазольной группы His-12 и о том, что при pH 5,5 он находится почти полностью в протонированной форме. В по-



димеры, как показано на схеме; из трех типов образующихся димеров два оказываются неактивными, поскольку в каждом из сформированных активных центров оказывается алкилированным либо His-119, либо His-12; в то же время в димерах третьего типа формируются один продуктивный активный центр (не включающий остаток алкилированных гистидинов), а другой неактивный, содержащий 1-См-His-119 и 3-См-His-12.

Определены пространственные структуры РНазы и РНазы-S; оказалось, что они отличаются только в области, в которой в РНазе-S расщеплена пептидная связь. Как видно из рис. 9.8, молекула имеет форму почки с выраженным углублением на одной стороне, в котором локализуются His-12 и His-119 — остатки, которые на основании данных, полученных с помощью химической

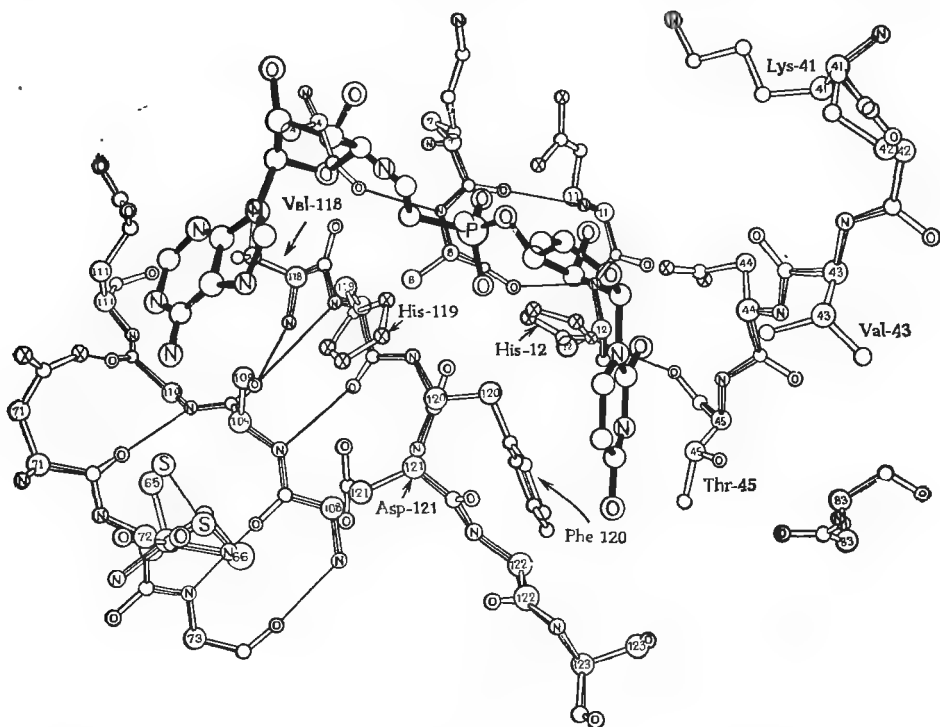


Рис. 9.9. Модель связывания динуклеотидфосфата UrCH_2A с РНазой-S (жирные линии — связи). His-119 показан в одном из четырех возможных положений, найденных при кристаллографическом исследовании. В нативном белке $\epsilon\text{-NH}_3^+$ группа Lys-41 смещена вниз и проецируется сзади фосфатной группы, однако не контактирует с ней. Метиленовая группа $-\text{CH}_2-$ (между фосфором и рибозой) ингибитора влияет на положение His-119. [Richards F. M., Wyckoff H. W., p. 647, in: P. Boyer, ed., *The Enzymes*, vol. IV, Academic Press, Inc., New York, 1971.]

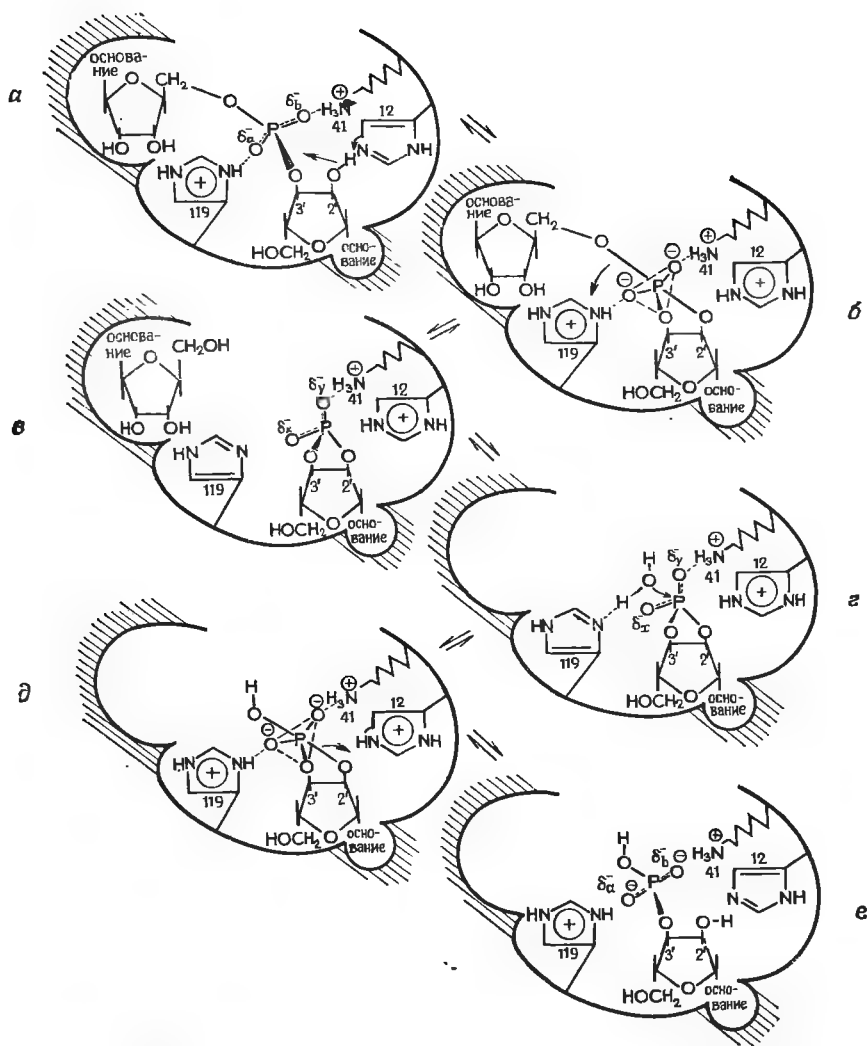


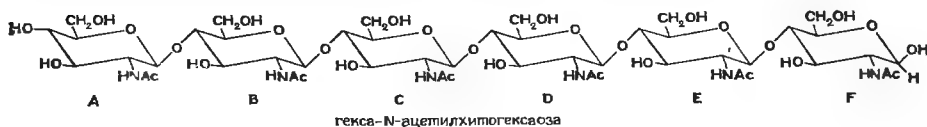
Рис. 9.10. Связывание субстрата. *a* — субстрат находится в активном центре, пуриновые и пиримидиновые кольца — в плотном контакте с соответствующими связывающими участками, а ϵ -NH₃⁺ Lys-41, так же как His-12 и His-119, — около отрицательно заряженного фосфата. *b* — в результате согласованного действия His-12, выступающего как основание, акцептирующее протон от 2'-ОН-группы рибозы, и His-119, выступающего как кислота и образующего водородную связь с атомом О фосфата, образуется промежуточный комплекс, в котором фосфор находится в пентакоординационном состоянии (тригональная бипирамида). *в* — образование циклического-2',3'-фосфоририбозного интермедиата сопровождается уходом протона от His-119 (His-12 уже присоединил протон). *г* — в активный центр вступает молекула воды, поставляющая протон His-119 и гидроксидную группу фосфату. *д* — образуется тригональная бипирамида, которая претерпевает перегруппировку при участии His-12, поставляющего протон. *е* — образуется продукт — пиримидинрибозо-3'-фосфат. [Roberts G. C. K., Dennis E. A., Meadows D. H., Cohen J. S., Jardesky O., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 62, 1151, 1969.]

модификации, рассматриваются как функциональные группы активного центра. Рентгеноструктурные исследования комплексов РНазы с различными ингибиторами показали, что все они, как можно было ожидать, связываются в одном и том же участке вблизи двух остатков гистидина. Ориентация в активном центре одного из ингибиторов UrA, у которого атом кислорода между фосфором и 5'-CH₂-группой рибозы аденина (А) заменен метиленовой группой (UrCH₂A), показана на рис. 9.9. Ориентация ингибитора в активном центре, вероятно, несколько отличается от таковой для субстрата; однако, как видно на рис. 9.9, His-12 и His-119 располагаются вблизи гидролизуемой фосфоэфирной связи. Пиримидиновое и пуриновое кольца локализуются в специфических областях. Пиримидиновое кольцо образует водородные связи с ОН-группой боковой цепи Thr-45 и NH-группой его пептидной связи. По одну сторону от пиримидинового кольца располагается Phe-120, а по другую Val-43. Поскольку эти остатки образуют углубление, в котором связывается пиримидиновое кольцо, то можно понять, почему происходит инактивация РНазы при отщеплении пепсином С-концевого фрагмента, содержащего остатки с 120-го по 124-й.

На основании данных, полученных с помощью рентгеноструктурного анализа и при исследовании свойств РНазы в растворе, предложено несколько схем механизма действия этого фермента; одна из них приведена на рис. 9.10. Данная схема не может считаться однозначно доказанной; однако ясно, что в случае катализа РНазой увеличение скорости реакции обусловлено специфическим связыванием различных групп субстрата соответствующими участками активного центра и, вероятно, согласованным действием His-12 и His-119, осуществляющим общий кислотно-основной катализ.

9.3.3. Лизоцим

Хорошие субстраты лизоцима — полисахариды клеточных стенок бактерий, повторяющейся единицей которых является дисахарид, состоящий из N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, связанных между собой β-1,4-связью (гл. 15). Более простым субстратом является гексамер N-ацетилглюкозамина — гекса-N-ацетилхитогексаоза, в котором гидролизуется одна гликозидная связь и при этом образуются тетра- и дисахарид.



Структура лизоцима из белка куриных яиц, содержащего 129 остатков, схематически изображена на рис. 9.11. Исследование структуры комплексов фермента с моно-, ди- и трисахаридами показало, что связывание сахаров происходит в «щели», находящейся между двумя половинами молекулы. Три-N-ацетилхитотриоза располагается при этом таким образом, что ее невозстанавливающий конец (сахар А) оказывается у начала щели, а восстанавливающий конец (сахар С) — в центральной ее части. Установлено, что при связывании субстрата происходит небольшое перемещение ($\sim 0,75 \text{ \AA}$) некоторых боковых групп внутри щели; это указывает на осуществление взаимодействия по типу «вынужденного контакта». На модели фермента внутри щели были размещены еще три остатка сахара, причем каждый последующий сахар «присоединялся» таким образом, чтобы его конформация была (насколько это возможно) такой же, как у первых трех остатков. Все остатки сахара (за исключением одного из шести) реализуют эффективные нековалентные взаимодействия с R-группами и пептидными группами (рис. 9.11); образуется много водородных связей и осуществляются неполярные контакты. Поскольку гидролиз происходит между четвертым и пятым остатками сахаров (D и E), особенно важно проанализировать окружение расщепляемой гликозидной связи. По одну сторону от связи на расстоянии $\sim 3 \text{ \AA}$ (от атома O) находится карбоксильная группа Glu-35, а по другую — расположена карбоксильная группа Asp-52. Поскольку Glu-35 находится в гидрофобном окружении, ее карбоксильная группа, вероятно, протонирована; Asp-52 участвует в образовании сложной сети водородных связей между гидрофильными группами, и ее карбоксильная группа, по-видимому, ионизирована. Поскольку эти карбоксильные группы являются ближайшими к атакуемой гликозидной связи, предполагается, что они участвуют в каталитическом процессе. Далее, если сахарный остаток D поместить в субстратной щели, сохраняя для него нормальную конформацию кресла, в которой, как предполагается, находятся все остальные остатки сахаров, то этот остаток должен был бы оказаться в слишком тесном контакте с группами, расположенными в щели. Если, однако, допустить, что этот остаток находится в напряженной конформации полукресла, то оказывается, что расстояния до соседних групп соответствуют нормальным, которые необходимы для контактов. Поэтому полагают, что при связывании субстрата остаток D находится в напряженном состоянии; при этом энергия, необходимая для поддержания остатка в невыгодной конформации полукресла, более чем компенсируется энергией связывания других остатков сахаров.

На основании рассмотренных выше представлений предложен механизм гидролиза гексасахарида (рис. 9.12). При связывании ферментом гексасахарида конформация сахарного остатка D ока-

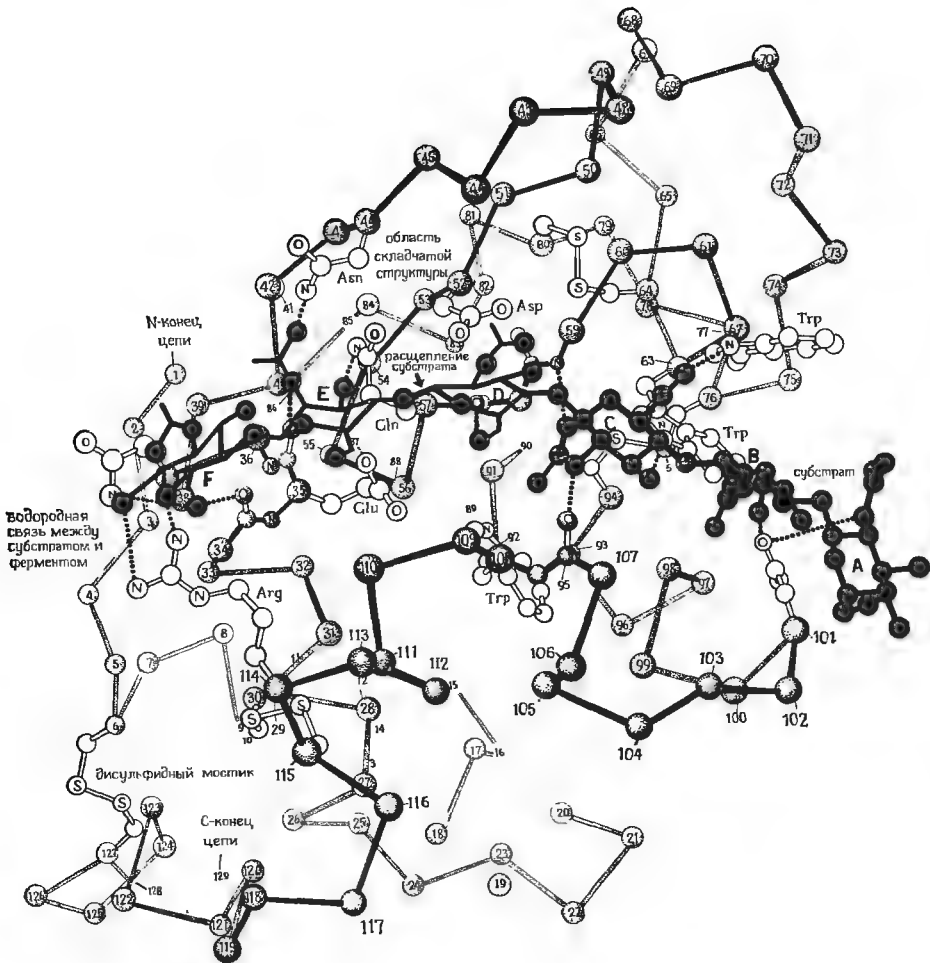


Рис. 9.11. Структура комплекса лизоцима яичного белка с субстратом — гекса-N-ацетилгитогексаозой. Показаны только R-группы, выстилающие зону активного центра и образующие большое число нековалентных взаимодействий с субстратом. А—F — остатки сахара (А — невозстанавливающий конец, F — восстанавливающий конец). Гидролиз происходит по гликозидной связи между D и E. Как описано в тексте, Asp-52 и Glu-35, находящиеся по обе стороны от места расщепления субстрата, участвуют в катализе. [Dickerson R. E., Geis J., Structure and Function of Protein, p. 71, Harper and Row, Publishers, New York, 1969.]

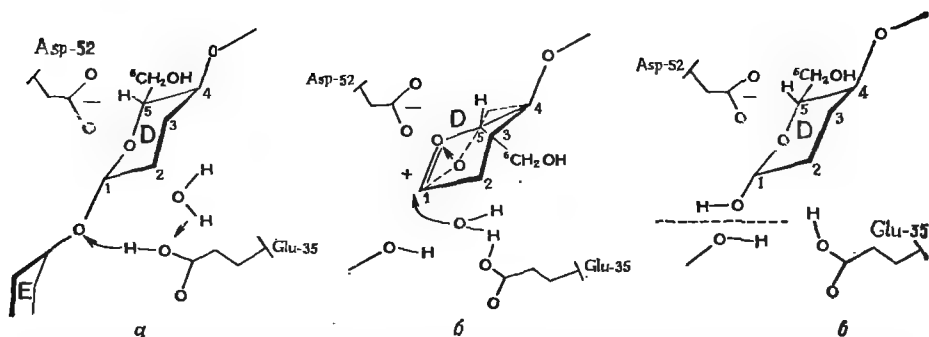
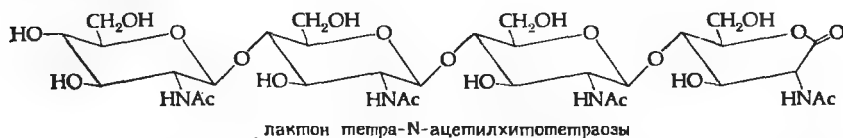


Рис. 9.12. Предполагаемый механизм действия лизоцима; гидролизу субстрата способствует специфическое связывание в активном центре остатков сахара А—Е. Показаны только остаток D и часть остатка Е. При связывании (*a*) субстрат оказывается в непосредственной близости от Asp-52 и Glu-35; последние участвуют в расщеплении D—Е гликозидной связи. Образующийся при этом интермедиат (*б*) реагирует с OH^- и H^+ (из воды), в результате чего образуется продукт и происходит возвращение фермента в исходное состояние (*в*). [Dickerson R. E., Geis I., Structure and Function of Protein, p. 77, Harper and Row, Publishers, Inc., New York, 1969.]

зывается напряженной. Glu-35 выступает донором протона для кислорода гликозидной связи между остатками сахаров D и E, что приводит к разрыву связи и образованию дисахарида (остатки E и F), удаляющегося из комплекса, и тетрасахарида, в состав которого входят остатки от A до D. При разрыве гликозидной связи остаток сахара D принимает форму карбониевого иона (C^+) и конформацию полукресла. Стабилизации карбониевого иона способствуют отрицательный заряд на Asp-52 и напряженное состояние остатка D. Известно, что распределение положительного заряда между углеродом и кислородом пиранозного кольца стабилизирует карбониевые ионы сахаров в конформации полукресла. Далее OH-группа воды присоединяется к атому C-1 карбониевого иона сахарного остатка D, а протон воды — к Glu-35; таким образом, реакция завершается.

В этом механизме увеличение скорости реакции достигается в результате совокупного действия ряда факторов: энергии специфического связывания субстрата, напряжения кольца сахара, эффекта вынужденного контакта; при этом Glu-35 выступает как общий кислотный катализатор, а Asp-52 способствует стабилизации карбониевого иона на промежуточной стадии реакции. Рассматриваемый механизм получил существенное подтверждение в дальнейших исследованиях ферментативной реакции. Во-первых, при определении энергии связывания каждого сахара оказалось, что энергетически невыгодным является связывание только одного остатка, именно сахара D, что согласуется с предположением о его

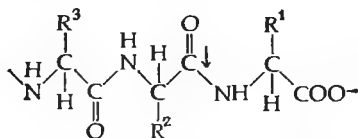
напряженной конформации (полукресло). Во-вторых, оказалось возможным в присутствии субстрата химически модифицировать все карбоксильные группы лизоцима, за исключением Asp-52 и Glu-35, сохраняя при этом активность; в отсутствие субстрата модифицируется также Asp-52 (но не Glu-35), однако активность полностью теряется. В-третьих, мощным ингибитором фермента является аналог переходного состояния, имеющий следующую структуру:



Сахар D ингибитора — лактон (для лактона конформация полукресла является нормальной); таким образом, этот тетрасахарид имеет такую же структуру, как остатки А—D субстрата при связывании с ферментом, и хорошо вписывается в субстратную щель; при этом энергия связывания оказывается благоприятной. В-четвертых, оптимум активности лизоцима находится при pH 5; по обе стороны от оптимума активность, как и следовало ожидать, понижается; если при более высоком pH происходит депротонирование Glu-35, то при более низком pH — протонирование Asp-52.

9.3.4. Карбоксипептидаза А

Субстратная специфичность этого фермента проиллюстрирована на приведенном ниже модельном субстрате



Гидролизуемая связь, обозначенная стрелкой, должна находиться по соседству со свободной α-карбоксильной группой; скорость гидролиза увеличивается, если R₁ — объемистая ароматическая или алифатическая группа. Дипептиды — плохие субстраты, в то же время α-N-ацилдипептиды оказались хорошими модельными субстратами. С-Концевой остаток должен иметь L-конфигурацию; наличие D-аминокислоты в положении R₂ значительно снижает скорость гидролиза. Сложные эфиры, подобные по структуре пептидным субстратам, также хорошо гидролизуются.

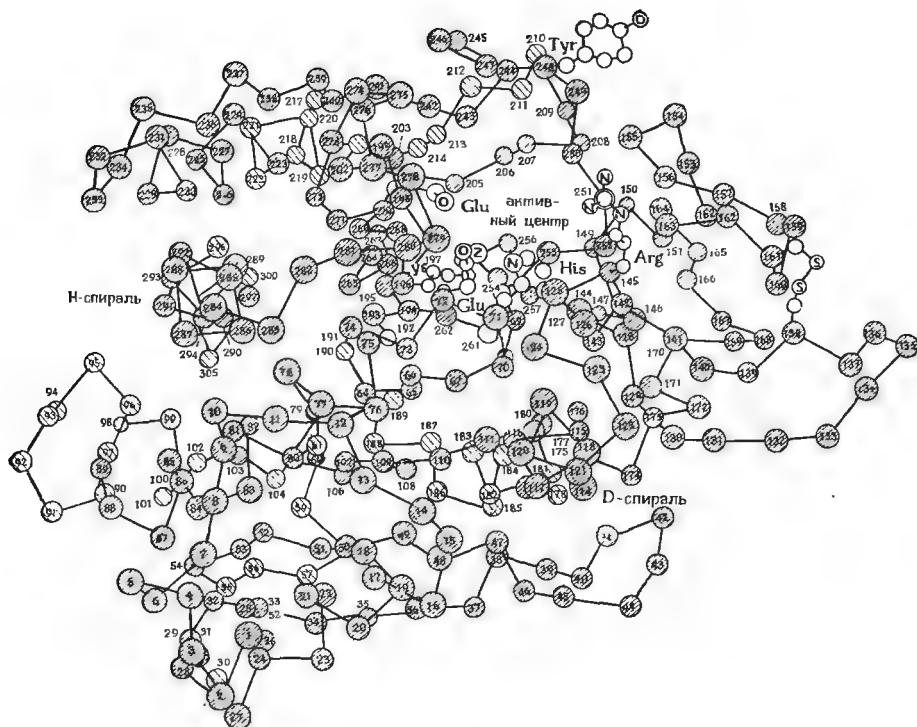


Рис. 9.13. Структура карбоксипептидазы А; показаны относительные расстояния между α -углеродными атомами и локализация функциональных групп активного центра, участвующих в связывании и катализе: атом цинка (Z), Glu-270, Tyr-248, Glu-72, His-69 и Arg-145. [Dickerson R. E., Geis I., The Structure and Function of Protein, p. 90, Harper and Row., Publishers, Inc., New York, 1969.]

Карбоксипептидаза А является металлоферментом, содержащим один атом цинка; она сильно ингибируется хелатообразующими соединениями. Цинк можно удалить; при этом фермент оказывается неактивным, но активность его восстанавливается при добавлении цинка или некоторых других металлов. Важная роль цинка в активном центре постулировалась много лет назад; были предложены механизмы гидролиза, которые оказались в хорошем соответствии с результатами последующих рентгеноструктурных исследований фермента и комплексов фермента с ингибиторами. Данные, полученные с помощью химической модификации, свидетельствуют о том, что один из остатков тирозина фермента может участвовать в катализе.

Пространственная структура карбоксипептидазы А схематически изображена на рис. 9.13. Структура комплекса с ингибитором

Gly—Tyr позволяет локализовать активный центр, который находится в неглубокой «впадине», проходящей около атома цинка и ведущей в гидрофобный «карман». Ориентация ингибитора в активном центре показана на рис. 9.14. Наиболее впечатляющим является вытеснение из активного центра при связывании субстрата по крайней мере пяти молекул воды, в том числе молекулы, связанной ранее с атомом цинка. Карбоксилатная группа субстрата связывается с гуанидиновой группой Arg-145, а фенольная гидроксильная группа Gly—Tyr находится в гидрофобном кармане. Атом цинка связан с боковыми цепями His-69, Glu-72 и His-196. Четвертое координационное положение цинка (в отсутствие ингибитора) занято водой; ориентация трех лигандов и воды вокруг атома цинка близка к тетраэдрической. В присутствии ингибитора в субстратсвязывающем участке обнаруживается ряд структурных изменений; это указывает на вероятность реализации эффекта вынужденного контакта. Arg-145 сдвигается на ~ 2 Å и вступает во взаимодействие с α -карбоксильной группой ингибитора, карбоксилатная группа Glu-270 смещается на ~ 2 Å, в направлении пептида, а Tyr-248 перемещается на ~ 12 Å, в результате его гидроксидная группа оказывается около —NH-группы атакующей связи. Перемещение тирозина, по-видимому, закрывает зону активного центра, и она становится недоступной для растворителя; это обстоятельство позволяет предполагать, что увеличение скорости ферментативной реакции может отчасти быть связано с эффектом десольватации (разд. 9.2.4). Кислород пептидной группы ингибитора приближен к атому цинка. Эти данные привели к

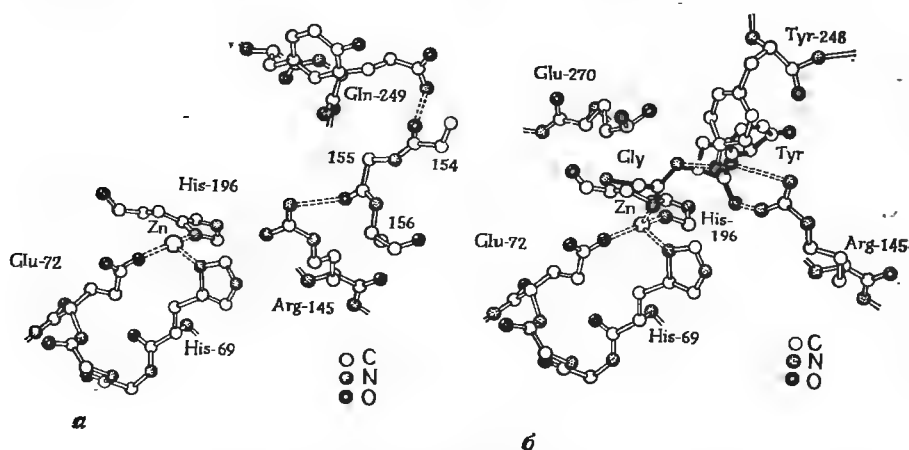


Рис. 9.14. Структуры активного центра карбоксипептидазы А в отсутствие (а) и в присутствии (б) Gly—L-Tyr. Связывание Gly—L-Tyr вызывает значительные перемещения Glu-270, Tyr-248 и Arg-145. [Blow D. M., Steitz T. A., Ann. Rev Biochem., 39, 63, 1970.]

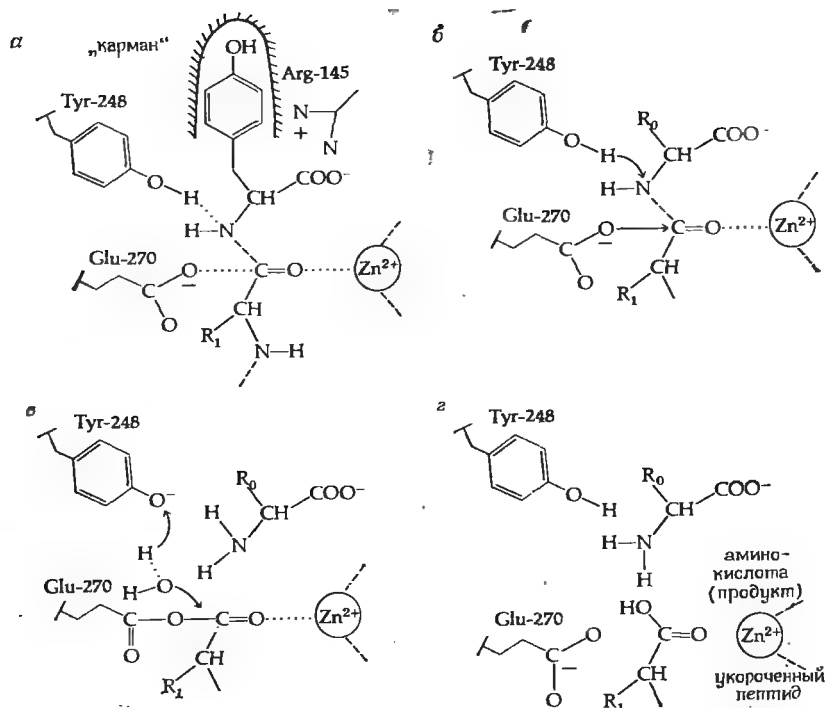


Рис. 9.15. Предполагаемые стадии катализируемого карбоксипептидазой А гидролиза пептида. *a* — связывание С-концевого фрагмента субстрата. В области активного центра может связываться несколько остатков (до шести) полипептидного субстрата, при этом образуется сложная сеть водородных связей и гидрофобных взаимодействий. Атом цинка образует координационные связи с двумя остатками гистидина и одним остатком глутаминовой кислоты. В тексте обсуждены превращения, происходящие на стадиях *a*–*г*.

формулировке механизма гидролиза, показанного на рис. 9.15. Glu-270 действует как нуклеофил, образуя ангидрид с $\text{C}=\text{O}$ -группой расщепляемой пептидной связи, одновременно Tyr-248 атакует —NH— группу гидролизующей связи. Атом цинка выступает как электрофил, поляризующий карбонильный кислород. Далее вода поставляет протон Tyr-248 и расщепляет ангидрид, восстанавливая исходную структуру активного центра; при этом освобождается второй продукт.

9.4. Заключительные замечания

Механизмы рассмотренных выше четырех ферментативных реакций могут потребовать пересмотра при получении новой инфор-

мации. В то же время эти механизмы достаточно полно учитывают основные данные, известные в настоящее время для каждого из ферментов. Хотя все четыре фермента являются гидролитическими и относительно простыми по сравнению с теми, о которых речь пойдет в последующих разделах, изложенные представления иллюстрируют основные принципы действия ферментов, включая различные механизмы, с помощью которых, как полагают, ферменты увеличивают скорости химических реакций. Кроме того, обсуждение приведенных механизмов показывает, что какой-либо один подход вряд ли позволит выяснить основы чрезвычайно высокой каталитической активности и субстратной специфичности данного фермента. Эти механизмы иллюстрируют также тонкость и сложность действия ферментов (предсказанную, вероятно, впервые Эмилем Фишером более 80 лет назад). Понимание механизма действия ферментов стало возможным (хотя и не в полной мере) только в последние два десятилетия благодаря разработке весьма совершенных методов исследования и формулировке новых биохимических принципов.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

- Bernhard S.*, The Structure and Function of Enzymes, W. A. Benjamin, Inc., New York, 1968.
- Boyer P. D.*, ed., The Enzymes, 3d ed., Academic Press, Inc., New York, 1970.
- Bray H. G., White K.*, Kinetics and Thermodynamics in Biochemistry, 2d ed., Academic Press, Inc., New York, 1967.
- Bruice T. C., Benkovic S.*, Bioorganic Mechanisms, vols. I, II, W. A. Benjamin, Inc., New York, 1966.
- Colowick S. P., Kaplan N. O.*, eds., Methods in Enzymology, Academic Press, Inc., New York. (Публикация этой серии начата в 1958 г. и продолжается в настоящее время.)
- Desnuelle P., Neurath H., Ottesen M.*, eds., Structure-Function Relationships of Proteolytic Enzymes, Academic Press, Inc., New York, 1970.
- Enzyme Models and Enzyme Structure, Brookhaven Symp. Biol., 15, Brookhaven National Laboratory, Brookhaven, N. Y., 1962.
- Florkin M., Stoltz E. H.*, eds., Comprehensive Biochemistry, sec. III, vols. 12—16, Biochemical Reaction Mechanisms, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, distributed by American Elsevier Publishing Company, Inc., New York, 1964—1966.
- Gutfreund H.*, Enzymes: Physical Principles, Wiley-Interscience, New York, 1972.
- International Union of Biochemistry, Enzyme Nomenclature, American Elsevier Publishing Company, Inc., New York, 1973.
- Jencks W. P.*, Catalysis in Chemistry and Enzymology, McGraw-Hill Book Company, New York, 1969.
- Klotz I. M.*, Energy Changes in Biochemical Reactions, Academic Press, Inc., New York, 1967.
- Meister A.*, ed., Advances in Enzymology, Interscience Publishers, division of John Wiley & Sons, Inc., New York. (Этот ежегодник публикуется начиная с 1941 г. и содержит много обзорных статей.)

- Segal I. H.*, Enzyme Kinetics, Wiley-Interscience, New York, 1975.
 Structure and Function of Proteins at the Three-Dimensional Level, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., vol. 36. Cold Spring Harbor, New York, 1972.
Webb J. L., Enzyme and Metabolic Inhibitors, vols. I—III. Academic Press, Inc., New York, 1963—1966.

Обзорные статьи

- Atkinson D. E.*, Regulation of Enzyme Action, Annu. Rev. Biochem., **35**, 81—124, 1966.
Eigen M., Hammes G., Elementary Steps in Enzyme Reactions. Adv. Enzymol., **25**, 1—38, 1963.
Bruice T. C., Some Pertinent Aspects of Mechanism as Determined with Small Molecules, Annu. Rev. Biochem., **45**, 331—373, 1976.
Gutfreund H., Transient and Relaxation Kinetics of Enzyme Reactions, Annu. Rev. Biochem., **40**, 315—344, 1971.
Gutfreund H., Knowles J. R., The Foundations of Enzyme Action, pp. 25—72 in: P. N. Campbell, G. D. Greville, eds., Essays in Biochemistry, vol. 3, Academic Press, Inc., New York, 1967.
Hess G. P., Rupley J. A., Structure and Function of Proteins, Annu. Rev. Biochem., **40**, 1013—1044, 1971.
Holzer H., Duntze W., Metabolic Regulation by Chemical Modification of Enzymes, Annu. Rev. Biochem., **40**, 345—374, 1971.
Jencks W. P., Binding Energy, Specificity and Enzyme Catalysis: The Circe Effect, Adv. Enzymol., **43**, 219—410, 1975.
Kirsch J. F., Mechanism of Enzyme Action, Annu. Rev. Biochem., **42**, 205—234, 1973.
Liljas A., Rossman M. G., X-ray Studies of Protein Interactions. Annu. Rev. Biochem., **43**, 475—507, 1974.
Koshland D. E., Jr., Neet K. E., The Catalytic and Regulatory Properties of Enzymes, Annu. Rev. Biochem., **37**, 359—410, 1968.
Monod J., Wyman J., Changeux J. P., On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model, J. Mol. Biol., **12**, 88—118, 1965.
Phillips D. C., The Three-dimensional Structure of an Enzyme Molecule, Sci. Am., **215**, 78—90, November 1966.
Quiocho F. A., Lipscomb W. N., Carboxypeptidase A: A Protein and an Enzyme, Adv. Protein Chem., **25**, 1—78, 1971.
Rose I. A., Mechanism of Enzyme Action, Annu. Rev. Biochem., **35**, 23—56, 1966.
Sigman D. S., Mooser G., Chemical Studies of Enzyme Active Sites, Annu. Rev. Biochem., **44**, 889—931, 1975.

ЧАСТЬ ТРЕТЬЯ

МЕТАБОЛИЗМ

Глава 10

ПРИНЦИПЫ БИОЭНЕРГЕТИКИ

*Термодинамические аспекты.
Окислительно-восстановительные реакции.
Высокоэнергетические фосфаты*

Процессы окисления в живой клетке имеют два основных назначения: обеспечить энергией все нуждающиеся в ней формы жизнедеятельности и превратить вещества пищи в компоненты клетки.

В настоящей главе рассматриваются в основном электрохимический и термодинамический аспекты окислительно-восстановительных реакций.

10.1. Основные начала термодинамики

Для понимания процессов преобразования энергии в биологических системах необходимо рассмотреть некоторые основные понятия термодинамики. В то время как превращения молекул происходят в соответствии с химическими законами, сама возможность осуществления этих превращений и полнота их протекания зависят от количества энергии, получаемой системой. Для изучения энергетики процессов привлекают термодинамику, главные положения которой выражены в первом и втором законах. Законы термодинамики позволяют предсказать направление химических процессов, т. е. понять, будет ли реакция проходить слева направо или справа налево (в соответствии с тем, как она записана), а также выяснить, можно ли использовать данную реакцию для совершения полезной работы или же для осуществления реакции требуется энергия, которая должна поставляться каким-то внешним источником. Основные начала термодинамики формулируются с помощью

функций, которые изначально были введены для описания процессов превращения энергии в физических системах, а именно с помощью *энтальпии, энтропии и свободной энергии*. Из перечисленных функций последняя оказалась наиболее полезной для описания биохимических процессов.

Первый закон термодинамики — это закон сохранения энергии. Даже для системы молекул в замкнутом объеме невозможно точно рассчитать общую энергию системы U . Но если система поглощает энергию в виде тепла Q , то через некоторое время

$$Q = \Delta U + W \quad (1)$$

где ΔU — изменение общей энергии системы, а W — суммарная работа (если таковая совершалась).

В некоторых случаях введение в систему тепловой энергии Q приводит к изменению объема; при этом давление остается постоянным. Фактически произведением $P\Delta V$ выражается один из возможных видов работы и, следовательно, это произведение должно входить в слагаемое W [уравнение (1)]. Однако поскольку $P\Delta V$ редко представляет собой полезную работу, удобнее связать изменение объема с общей энергией системы U ; для этого была введена функция H , называемая *энтальпией* или *теплосодержанием*. Изменение энтальпии в любом процессе при постоянном давлении выражается уравнением

$$\Delta H = \Delta U + P\Delta V \quad (2)$$

Тогда первый закон термодинамики математически формулируется следующим образом:

$$Q = \Delta H + W' \quad (3)$$

где W' — *полезная работа*, выполненная благодаря введению определенного количества тепла Q .

Уравнение (3) справедливо для идеальной обратимой системы, т. е. такой системы, которая, будучи переведенной в новое состояние путем поглощения энергии, может вновь возвратиться в исходное состояние, освободив то же самое количество ранее поглощенной энергии, причем эта энергия может быть использована для совершения новой работы. В природе, однако, полностью обратимых систем не существует. Некоторая доля приращения энтальпии, происходящего в результате поглощения системой энергии, не может быть использована для выполнения полезной работы при протекании процесса в обратном направлении. Так, общезвестно, что большинство физических и химических процессов протекает самопроизвольно только в одном направлении, например, вода бежит вниз, протоны и гидроксидные ионы соединяются, выделяя тепло. Однако нагревание воды не заставляет ее двигаться вверх, а также не приводит к диссоциации воды на протоны и гидроксидные

ионы. Такие процессы можно описать, если ввести понятие «равновесие». *Самопроизвольные изменения любой системы направлены на достижение состояния равновесия, но не обратно.* Это одна из формулировок второго закона термодинамики. Математически наиболее просто описать второй закон термодинамики с помощью другой термодинамической функции — *энтропии* S , представляющей собой долю энтальпии, которая не может быть использована для совершения полезной работы; в большинстве случаев такие «потери» подводимой энергии объясняются тем, что энергия расходуется на усиление беспорядочного движения молекул в системе. Следовательно, можно предложить более общее определение для новой функции: энтропия — это мера случайности или разупорядоченности системы. Произведение TS (где T — абсолютная температура) выражает энергию, «потерянную» в результате беспорядочного движения молекул. Второй закон термодинамики утверждает, что любая система, если предоставлена возможность, претерпевает самопроизвольные изменения, приводящие к увеличению энтропии, т. е. к разупорядоченности. Равновесие устанавливается тогда, когда энтропия достигает максимального значения; никаких дальнейших самопроизвольных изменений происходить не может, если только к системе не подводится извне дополнительная энергия.

Теперь рассмотрим последствия введения тепла в систему. Поскольку теплота представляет собой кинетическую энергию беспорядочного движения молекул, подведение тепла к системе увеличивает энтропию. Если система находится в равновесии, то

$$Q = T\Delta S \quad (4)$$

Однако, если система не равновесна, в ней могут происходить самопроизвольные процессы, сопровождающиеся увеличением энтропии, даже если система не получает дополнительного тепла. В общем случае для систем, не находящихся в равновесии,

$$T\Delta S > Q \quad (5)$$

Объединим уравнения (3) и (4) (т. е. «объединим» первый и второй законы термодинамики), тогда для равновесной системы получим

$$\Delta H = T\Delta S - W' \quad (6)$$

Однако для биохимических исследований равновесное состояние редко представляет интерес. Главное внимание в биохимии уделяется реакциям, протекающим, как и полагается, в направлении, соответствующем стремлению к равновесию, и при постоянной температуре. Для таких систем с учетом уравнений (5) и (6) можно записать следующее:

$$\Delta H < T\Delta S - W' \quad (7)$$

Это позволяет ввести новую термодинамическую функцию, которая является наиболее полезной при биохимических исследованиях,— *свободную энергию G*

$$G = H - TS \quad (8)$$

В общем случае изменение свободной энергии ΔG характеризует энергию, которая при надлежащих условиях становится доступной для совершения работы, в то время как система стремится к равновесию. Для процесса при постоянной температуре

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (9)$$

Это наиболее подходящая форма выражения законов термодинамики при описании биохимических систем. Для системы, не находящейся в равновесии, справедливо

$$\Delta G = -W' \quad (10)$$

Таким образом, системы, не находящиеся в равновесии, претерпевают самопроизвольные изменения, только если при этом свободная энергия *уменьшается* (приращение свободной энергии *отрицательно*). Когда равновесие достигнуто, никакого дальнейшего самопроизвольного изменения свободной энергии системы происходить не может. Если система находится в равновесии, количество *доступной* свободной энергии равно нулю. И напротив, систему, уже находящуюся в равновесии, можно вывести из него, только если каким-то образом ей становится доступна свободная энергия. Такого рода использование свободной энергии представляет собой выполнение работы.

10.1.1. Химические равновесия

Явление диффузии свидетельствует о том, что свободная энергия раствора является функцией его концентрации. При контакте концентрированного и разбавленного растворов происходит диффузия растворенного вещества из первого во второй раствор до тех пор, пока в этих растворах не установится одинаковая концентрация.

Поскольку такой процесс происходит самопроизвольно, изменение свободной энергии более концентрированного раствора, который в результате диффузии становится более разбавленным, должно быть отрицательным, и при надлежащих условиях эта энергия могла бы быть использована для совершения работы. Действительно, такие системы представляют собой важные физиологические устройства. Зависимость изменения свободной энергии от концент-

рации растворенного вещества описывается логарифмическим уравнением

$$\Delta G = G^\circ + RT \ln [C] \quad (11)$$

где R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, $[C]$ — молярная концентрация растворенного вещества и G° — стандартная свободная энергия, т. е. свободная энергия раствора при концентрации 1 моль/л. Однако интерес представляют не эти абсолютные величины, а их изменения, связанные с протеканием химических реакций.

Для любой химической реакции можно записать



и

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad (12)$$

где $\Delta G^\circ = G^\circ_C + G^\circ_D - G^\circ_A - G^\circ_B$. Уравнение (12) применимо для любых условий. Однако в условиях равновесия $\Delta G = 0$. Следовательно, если $[C][D]/[A][B] = K$, где K — константа равновесия, то

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (13)$$

или при 37°C

$$\Delta G^\circ = -1420 \lg K \quad (14)$$

Отсюда следует, что десятикратное увеличение или уменьшение K приводит к соответствующему изменению ΔG° на 1420 кал/моль. Например, если K равно 10, 10^4 , 10^7 или 10^{-5} , то ΔG° соответственно равно —1420, —5680, —9940 или +7100 кал/мол. Таким образом, стандартная свободная энергия химической реакции, т. е. свободная энергия, освобождающаяся при взаимодействии 1 моля каждого из реагентов с образованием 1 моля каждого из продуктов при неизменных стандартных условиях, может быть вычислена по экспериментально найденным значениям константы равновесия. Если ΔG° отрицательна, процесс может происходить самопроизвольно; если же она положительна, реакция может происходить только при условии поступления извне доступной свободной энергии. Величины ΔG° могут выражаться в джоулях или калориях на моль.

10.1.2. Преобразование энергии в живых системах

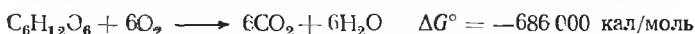
В тепловых двигателях энергия, освобождающаяся в процессе окисления топлива, используется для выполнения работы за счет индуцированного теплом температурного градиента, как, например, в паровом двигателе. Однако, ввиду того что клетки не могут генерировать или выдерживать сколько-нибудь существенные температурные градиенты, они должны преобразовать освобождаемую

путем окисления энергию в какую-либо химическую энергию, прежде чем она рассеется в виде тепла. У всех живых организмов это преобразование энергии осуществляется путем сопряжения процесса окисления с синтезом из аденозиндифосфата ADP и неорганического фосфата P_i единственного соединения — аденозинтрифосфата АТФ:



Стандартная свободная энергия ΔG° образования АТФ в этой реакции составляет около +8400 кал/моль. При 37°C, pH 7,4 и обычных биологических концентрациях ADP и P_i фактически требующаяся свободная энергия ΔG равна ~12 000 кал/моль. Энергия АТФ в свою очередь может утилизироваться клеткой для проведения всех известных эндергонических процессов, таких, как химические синтезы, транспорт ионов и механическая работа.

Однако 12 000 кал/моль — это незначительная величина по сравнению со всем количеством энергии, которое освобождается при полном окислении глюкозы; оно составляет 686 000 кал/моль:



Для того чтобы можно было наилучшим образом (наиболее полно) использовать энергию, выделяющуюся при окислении глюкозы, процесс окисления глюкозы должен быть разделен на возможно большее число менее крупных стадий; каждая из этих стадий должна сопровождаться изменением свободной энергии, немного превышающим 12 000 кал/моль, т. е. изменение свободной энергии должно быть достаточным для осуществления синтеза АТФ. В живых клетках на одну молекулу полностью окисленной глюкозы синтезируется 38 молекул АТФ.

Из всего вышесказанного следует, что если не произойдет рассеивания энергии в виде тепла, в изотермических условиях энергия может неоднократно преобразовываться. Так, энергия, поступающая в организм при введении в него глюкозы, прежде всего аккумулируется в молекуле АТФ, а затем может быть передана вновь синтезированную белковую молекулу и, наконец, выделиться в виде тепловой энергии, когда белок гидролизует на составляющие его аминокислоты. Происходящее суммарное изменение энергии согласуется со значениями, рассчитанными при определениях количества тепла, выделяемого при окислении глюкозы в калориметрической бомбе. Ввиду того что каждое из последовательных преобразований энергии в данной цепи реакций включает выделение тепла и недоступной энергии в виде энтропии, с точки зрения экономики организма метаболические превращения могут показаться неэффективными. Однако именно эта «неэффектив-

ность» определяет *направление* метаболических процессов. Например, если в процессе



для каждой стадии $\Delta G = 0$, а $K = 1$, то превращения вещества А заканчивались бы при образовании смеси равных количеств А, В, С, D и Е. Если же для каждой стадии ΔG велика и отрицательна, особенно для стадии $D \rightleftharpoons E$, то вещество А должно почти полностью превратиться в вещество Е. Потеря некоторого количества химической энергии является, таким образом, «платой» за осуществление полного химического превращения.

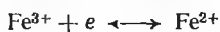
В этой связи может возникнуть вопрос, почему животному необходима энергия, дополнительная к той, которая требуется для выполнения работы. Этот вопрос особенно важен, если говорить о взрослых животных, масса и состав тела которых сохраняются практически постоянными в изотермических условиях окружающей среды. В принципе *главное назначение энергии, генерируемой в процессах биологического окисления, заключается в поддержании организма в состоянии, удаленном от равновесия*. Это положение можно проиллюстрировать на нескольких примерах. Как известно, клетки содержат большие количества полисахаридов, белков, липидов и нуклеиновых кислот при относительно малых концентрациях их составных частей, т. е. глюкозы, аминокислот и т. д. Однако в условиях равновесия в присутствии соответствующих ферментов должна была бы преобладать как раз обратная ситуация. Опять-таки ионный состав раствора, омывающего клетки, существенно отличается от состава раствора внутри клетки, несмотря на то, что клеточная мембрана проницаема для ионов и в том и другом направлении. Свободная энергия, получаемая организмом при окислении глюкозы, используется для синтеза полисахаридов, белков и т. д., причем скорость синтеза равна скорости распада этих соединений, происходящего в соответствии со стремлением всех компонентов системы к состоянию равновесия. Подобным же образом получаемая энергия используется для выталкивания различных ионов из клетки в противовес тенденции к достижению ионного равновесия по обе стороны клеточной мембраны в результате перехода ионов в клетку. При гидролизе крупных молекул или возвращении ионов в клетку потери энергии обусловлены как изменениями энтропии, так и отсутствием способов утилизации освободившейся в итоге указанных процессов энергии. Некоторое время спустя, так как скорости протекания процессов в обоих направлениях одинаковы, вся полученная от окисления глюкозы энергия превращается в тепло, но благодаря этому процессу в системе поддерживается неравновесное состояние. Таким образом, благодаря уменьшению «упорядоченности» веществ пищи в результате окисления поддерживается высокая степень «упорядоченности» в клет-

же. Можно предположить, что совокупность таких процессов в организме вносит главный вклад в определение скорости основного метаболизма (разд. 11.1.2). Если снабжение пищей или кислородом прекращается, ничто не препятствует стремлению к равновесию, и ожидаемые равновесия достигаются.

Цель этой и следующей главы состоит в том, чтобы описать, каким образом происходит окисление веществ пищи молекулярным кислородом, а свободная энергия окисления становится доступной для эндергонических процессов в живых клетках.

10.2. Окислительно-восстановительные реакции

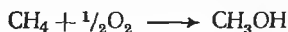
Реакции, включающие перенос электронов, называются *окислительно-восстановительными реакциями*. Потеря электрона — это окисление, принятие электрона — восстановление. В некоторых случаях перенос электронов описывается уравнением реакции, как, например при электролитическом восстановлении иона трехвалентного железа в ион двухвалентного железа:



Перенос электронов очевиден также в реакции

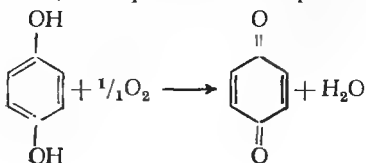


в которой Cu^+ окисляется, а Fe^{3+} восстанавливается. Для понимания не столь очевидного окислительно-восстановительного характера реакций между ковалентными соединениями следует привлечь понятие электроотрицательности и различной степени поделенности электронов. Так, рассмотрим окисление метана

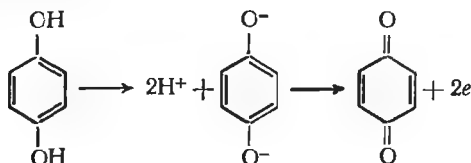


В результате этой реакции происходит замена связи C—H на связь C—OH. Поскольку кислород более электроотрицателен, чем водород, он оттягивает электроны от атома углерода. Дипольный момент метанола характеризует величину смещения электронов от атома углерода, подвергшегося окислению, к атому кислорода, который восстановился, хотя при этом оба атома всего лишь «поделили» электронную пару.

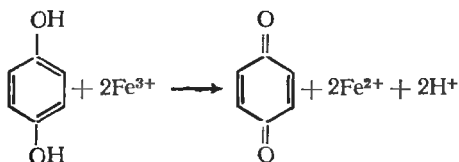
Окисление органических соединений во многих случаях по существу означает отнятие водорода (дегидрирование). Рассмотрим окисление гидрохинона, которое можно представить как



Эту реакцию можно также рассмотреть по стадиям, первая из которых является кислотной диссоциацией, а вторая сводится к потере электронов:



Если бы окислителем был ион трехвалентного железа, суммарную реакцию можно было бы записать следующим образом:



В приведенном примере протоны и электроны независимо отделяются от окисляемой молекулы. В других случаях механизм может включать перенос протона вместе со связанным с ним электроном, т. е. атома водорода $\text{H}\cdot$, или протона со связанной парой электронов, т. е. гидрид-иона H^- .

10.2.1. Условия, облегчающие перенос электронов

Существует несколько условий, облегчающих миграцию электронов от одной химической группировки к другой. Если электрон может свободно перемещаться внутри большой молекулярной орбитали высокорезонансной структуры, его связь с любым отдельным атомным ядром в пределах этой структуры будет слабее, чем если бы его перемещение было ограничено маленькой орбиталью вокруг определенного ядра. Так, катионы металлов, участвующие в переносе электронов в биологических системах, бывают обычно окружены большими резонансными лигандами, облегчающими быстрый перенос электронов. Отрицательный заряд этой резонансной структуры, отталкивая электрон, также способствует его потере. Поэтому фенолят-анион легче окисляется по сравнению с фенолом. Перенос электронов между одинаково заряженными частицами, например между катионами металлов, часто облегчается противоположно заряженными лигандами, которые функционируют в качестве мостиков, проводящих электроны. Так, в небιологической системе, например при восстановлении комплексов трехвалентного кобальта ионами двухвалентного хрома, множество анионов облег-

менту для одного неспаренного электрона, т. е. магнетону Бора. Такая молекула называется *парамагнитной*. Молекулы, не обладающие магнитным моментом, называются *диамагнитными*. Их можно различать с помощью устройств, измеряющих магнитную восприимчивость.

10.2.2.1. Электронный парамагнитный резонанс

Наиболее чувствительным и удобным способом для обнаружения и исследования свободных радикалов является метод *электронного парамагнитного резонанса*. Когда совокупность молекул в свободнорадикальной форме находится в нулевом магнитном поле, спины и магнитные моменты их неспаренных электронов ориентированы случайным образом, и все эти электроны обладают одинаковой энергией. Однако в магнитном поле неспаренные электроны должны выстраивать свои магнитные моменты параллельно или антипараллельно данному полю. Частицы, выстроенные параллельно полю, имеют энергию на $\frac{1}{2}g\beta H$ меньшую, чем значение при нулевом поле, а энергия выстроенных антипараллельно частиц на $\frac{1}{2}g\beta H$ превышает значение в нулевом поле. Таким образом, разность энергий для этих двух групп неспаренных электронов равна $g\beta H$, где β — постоянная (магнетон Бора), H — напряженность магнитного поля (в гауссах) и g — *спектроскопический фактор расщепления*, который является характеристическим параметром для неспаренных электронов данного органического свободного радикала или парамагнитного атома (металла). Точное значение g определяют путем исследования спектров электронного парамагнитного резонанса следующим образом. При воздействии электромагнитного излучения на раствор свободных радикалов некоторые антипараллельные (с более низкой энергией) электроны поглощают энергию, «обрашая» свои магнитные моменты и, таким образом, оказываются на более высоком энергетическом уровне. В каждом магнитном поле с заданной напряженностью H это возможно только при таких значениях частоты ν , при которых энергия $h\nu$ поглощенного кванта точно совпадает с разностью энергетических уровней между двумя классами неспаренных электронов, а именно когда $h\nu = g\beta H$. Таким образом, спектроскопический фактор расщепления выражается как

$$g = \frac{h\nu}{\beta H}$$

В принципе резонансное поглощение может происходить при любой частоте электромагнитного излучения, если только напряженность магнитного поля удовлетворяет приведенному выше уравнению. На практике удобно использовать генератор с фиксированной частотой на выходе, изменять напряженность магнитного поля и измерять поглощение энергии излучения образцом.

Для изолированного электрона $g = 2,0023$. Тот факт, что органические свободные радикалы дают значения g , очень близкие к 2,00, свидетельствует об очень незначительном влиянии остальной части молекулы на неспаренный электрон. И, напротив, значение g для иона парамагнитного металла — характеристический параметр этого металла и его лигандов.

Свободные радикалы обычно интенсивно окрашены, поскольку они поглощают энергию света в видимой и дальней красной областях спектра. Это часто дает возможность обнаружить и измерить их методом спектрофотометрии, так как максимумы поглощения полностью окисленной или восстановленной формы одного и того же соединения, как правило, четко различаются.

Из самого факта существования окислительно-восстановительных реакций следует, что молекулы и атомы отличаются по своему

Таблица 10.1

Электродные потенциалы E'_0 некоторых окислительно-восстановительных систем^a

Система ^b	E'_0 , В	пН
$\text{OH}\cdot + \text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$	1,35	7,0
$1/2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$	0,82	7,0
$\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$	0,42	7,0
Диоксифенилаланин/фенилаланин	0,37	7,0
Феррицианид/ферроцианид	0,36	7,0
$1/2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}_2$	0,30	7,0
Fe^{3+} -цитохром <i>a</i> / Fe^{2+}	0,29	7,0
Fe^{3+} -цитохром <i>c</i> / Fe^{2+}	0,22	7,0
(2,6-Дихлорфенолиндифенол) _{ок} /(2,6-дихлорфенолиндифенол) _{ред}	0,22	7,0
Кротонил-СоА/бутирил-СоА	0,19	7,0
Метгемоглобин/гемоглобин	0,17	7,0
Fe^{3+} -цитохром <i>b</i> ₂ / Fe^{2+}	0,12	7,4
(Убихинон) _{ок} /(убихинон) _{ред}	0,10	7,4
Дегидроаскорбиновая кислота/аскорбиновая кислота	0,08	6,4
Fe^{3+} -цитохром <i>b</i> / Fe^{2+}	0,07	7,4
Фумаровая кислота/янтарная кислота	0,03	7,0
(Метилновый синий) _{ок} /(метилновый синий) _{ред}	0,01	7,0
FMN-старый желтый фермент/FMNH ₂	-0,12	7,0
Пировиноградная кислота + NH ₄ ⁺ /аланин	-0,13	7,0
α -Кетоглутаровая кислота + NH ₄ ⁺ /глутаминовая кислота	-0,14	7,0
Щавелевоуксусная кислота/яблочная кислота	-0,17	7,0
Пировиноградная кислота/молочная кислота	-0,19	7,0
Ацегальдегид/этанол	-0,20	7,0
(Глутатон) _{ок} /(глутатон) _{ред}	-0,23	7,0
Ацетоуксусная кислота/ β -оксимасляная кислота	-0,27	7,0
1,3-Дифосфоглицериновая кислота/глицеральдегид-3-фосфат + P _i	-0,29	7,0
(Липоевая кислота) _{ок} /(Липоевая кислота) _{ред}	-0,29	7,0
(Флаводоксин) _{ок} /(флаводоксин) _{ред} (кlostридиальный)	-0,31	7,0
NAD ⁺ /NADH + H ⁺	-0,32	7,0
Пировиноградная кислота + CO ₂ /яблочная кислота	-0,33	7,0
Мочевая кислота/ксантин	-0,36	7,0

Продолжение табл. 10.1

Система ^б	E'_0 , В	pH
(Ферредоксин) _{ок} /(ферредоксин) _{ред} (из водорослей)	—0,41	7,5
Ацетил-СоА/ацетальдегид + СоА	—0,41	7,0
(Ферредоксин) _{ок} /(ферредоксин) _{ред} (<i>Clostridium pasteurianum</i>)	—0,42	7,5
H ⁺ /1/2H ₂	—0,42	7,0
(Ферредоксин) _{ок} /(ферредоксин) _{ред} (из шпината)	—0,43	7,5
O ₂ /O ₂ ^{•-}	—0,45	7,0
Уксусная кислота/ацетальдегид	—0,60	7,0
α -Кетоглутаровая кислота/янтарная кислота + CO ₂	—0,67	7,0
Пировиноградная кислота/уксусная кислота + CO ₂	—0,70	7,0

^а E'_0 (так называемый среднеточечный потенциал) — разность потенциалов (показания потенциометра) между стандартным водородным электродом и инертным электродом, который находится в растворе, содержащем эквимольные количества (при указанных pH) окисленной и восстановленной формы данной электроактивной пары. Замыкание цепи достигается с помощью солевого мостика между стандартным электродом и исследуемым раствором.

^б Индексы Ox и Red обозначают окисленную и восстановленную форму вещества соответственно; P_i — неорганический ортофосфат.

средству к электронам. Такого рода различия в средстве к электронам описываются в виде хорошо известного ряда электродвижущих сил (э. д. с.) элементов, который количественно отображает тенденцию элемента получать или терять электроны. За точку отсчета шкалы электродвижущих сил принят потенциал стандартного водородного электрода, значение которого произвольным образом считают равным нулю, $E_0=0$. Соглашение, соблюдаемое при составлении таблицы э. д. с., устанавливает знак плюс для потенциалов элементов, которые являются более сильными восстановителями, чем газообразный водород, и знак минус для потенциалов элементов, являющихся более слабыми восстановителями. В соответствии с указанным соглашением металлы, расположенные левее в ряду элементов по их э. д. с., могут вытеснять любой металл, расположенный правее, из его солей. Кроме того, чем более удалены друг от друга металлы в ряду, тем больше их относительная окислительная или восстановительная способность. Для органических веществ также могут быть составлены такого рода ряды, отражающие их относительное средство к электронам. В этом случае, однако, условия описания изменены, и чем более эффективно вещество в качестве восстановителя, тем отрицательнее его окислительно-восстановительный потенциал. Несколько интересных в этом отношении систем представлено в табл. 10.1.

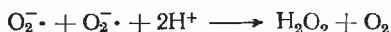
10.2.3. Реакции окисления с участием молекулярного кислорода

В основном состоянии молекулярный кислород парамагнитен и обладает двумя неспаренными электронами; фактически он представляет собой бирадикал. Молекулярный кислород легко вступает в реакцию с веществами, содержащими одиночные неспаренные электроны, в то время как его взаимодействие с веществами, все электроны которых спарены, затруднено из-за спиновых запретов. Антипараллельные спины электронов таких веществ не позволяют одному электрону из данной пары образовать пару с неспаренными электронами кислорода в основном состоянии. По этой причине реакции с кислородом в основном состоянии обычно осуществляются по свободнорадикальным механизмам. При особых условиях кислород может также находиться в двух низколежащих, возбужденных синглетных состояниях, не содержащих неспаренных спинов и, следовательно, свободных от спиновых запретов, препятствующих взаимодействию с обычными ковалентными соединениями. Такой синглетный кислород необычайно реакционноспособен и участвует во многих реакциях фотохимического окисления; однако в обычных биологических процессах окисления синглетный кислород вряд ли играет существенную роль.

Реакция восстановления кислорода (образование воды) требует четыре электрона. Если протекание этого процесса делится на последовательные одноэлектронные стадии, то в качестве промежуточных продуктов, вероятно, выступают надпероксидный (супероксидный) анион O_2^- , пероксид водорода H_2O_2 и гидроксидный радикал $OH\cdot$. Эти реакционноспособные частицы потенциально ядовиты для живых систем, что особенно справедливо для радикалов O_2^- и $OH\cdot$, которые, как полагают, входят в группу мутагенных радикалов, возникающих при ионизирующей радиации. Поэтому, согласно основным механизмам биологического восстановления кислорода, эти процессы проходят через стадии, непосредственно приводящие к образованию H_2O_2 или H_2O . Так, цитохромоксидаза и содержащие медь оксидазы проводят полное четырехэлектронное восстановление кислорода до воды, а флавоферменты обычно катализируют двухэлектронное восстановление кислорода до пероксида водорода, прежде чем эти продукты освобождаются с поверхности фермента.

Существуют, однако, ферментативные и неферментативные реакции, важные в биологии, в результате которых происходит одноэлектронное восстановление кислорода. В некоторых случаях образованный таким образом надпероксидный (супероксидный) радикал употребляется в последующей реакции, но в других он просто освобождается с поверхности фермента. Организмы, использующие кислород, должны, таким образом, сталкиваться с угрозой внут-

риклеточного образования O_2^- и H_2O_2 . Для защиты от этих реакционноспособных соединений кислорода служат ферментативные защитные механизмы. С помощью *супероксиддисмутазы* (разд. 13.7.4) надпероксидный радикал преобразуется в пероксид водорода согласно реакции



Пероксид водорода удаляется в свою очередь с помощью *каталазы*: (разд. 8.4.5), которая катализирует реакцию



Организмы, которые не выработали такие защитные (от потенциальной токсичности кислорода) механизмы, могут обитать только в анаэробных условиях.

10.2.4. Количественные аспекты окислительно-восстановительных реакций

Когда металлическая пластинка, например цинковая, называемая здесь *электродом*, помещается в водный раствор, некоторые атомы цинка на поверхности металла отдают электроны и образуют ионы цинка Zn^{2+} в растворе у поверхности пластинки. Электроны остаются на пластинке и сообщают ей отрицательный заряд. Таким образом возникает *двойной электрический слой*. Разность потенциалов в этом слое есть *электродный потенциал*. Рассматриваемый процесс обратимый; через короткий промежуток времени ионы цинка в растворе начинают вновь соединяться с электронами на поверхности металла с образованием атомов цинка. При равновесии скорость, с которой ионы из раствора соединяются с электронами на поверхности металла с образованием атомов, равна скорости потери атомами цинка электронов с образованием ионов в растворе, и на электроде устанавливается обратимый потенциал.

Ионизация молекулярного водорода также является окислительным процессом:



с константой диссоциации

$$K = \frac{[H^+][e]}{[H_2]^{1/2}}$$

где $[e]$ — *давление электронов* в том месте, где происходит ионизация. Давление электронов должно быть тесно связано с экспериментально измеряемым параметром — *электродным потенциалом*.

Поскольку водород — это газ, он не может непосредственно использоваться в качестве электрода. Если на поверхности инертного металла, например платины, покрытой тонкодисперсной платиной («платиновой чернью»), адсорбировать газообразный водород,

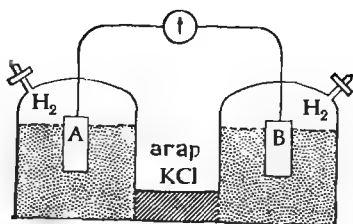
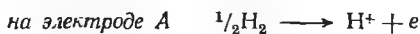


Рис. 10.1. Электролитическая ячейка, состоящая из двух водородных электродов.

то на такой поверхности происходит обратимая диссоциация адсорбированного водорода и полученная таким образом система функционирует в качестве водородного электрода. Из приведенной выше формулы следует, что потенциал этого электрода является функцией отношения $[H^+]/[H_2]^{1/2}$, т. е. относительной концентрации окисленной и восстановленной форм водорода. Потенциал можно определить посредством сравнения со вторым электродом и измерения разности потенциалов между этими двумя электродами. Если потенциал одного электрода произвольно принят равным нулю, все другие электродные потенциалы могут быть соотнесены с ним и количественно выражены в вольтах. За электрод сравнения принят *стандартный водородный электрод* под давлением 1 атм, потенциал которого считается равным нулю в растворе с активностью ионов водорода, равной единице. Рассмотрим ячейку, состоящую из двух водородных электродов (рис. 10.1), в которой оба раствора изначально характеризуются одинаковой $[H^+]$, однако давление водорода для электрода В меньше 1 атм. Если электроды соединить проводником, электроны будут двигаться по внешней цепи от электрода А к электроду В. При этом будут иметь место следующие реакции:



Суммарная реакция запишется как перенос ионов водорода от В к А. Ток во внешней цепи идет до тех пор, пока в обоих сосудах отношение $[H^+]/[H_2]^{1/2}$ не станет одинаковым. Для поддержания электронейтральности анионы, например Cl^- , должны двигаться по солевому мостику от В к А. Если потенциометр помещен между В и А, стремление электронов двигаться от А к В можно измерить. Полученный результат есть разность потенциалов E (в вольтах). В рассматриваемом примере электрод А несет отрицательный заряд, так как электроны поступают от А к В.

Поведение ионов в разбавленном растворе подчиняется законам для идеальных газов, пользуясь которыми можно найти коли-

чественное выражение, *уравнение Нернста*, для разности потенциалов между электродами А и В

$$-E = \frac{RT}{F} \ln [H_2]_B^{1/2} \quad \text{или} \quad -E = \frac{RT}{2F} \ln [H_2]_B \quad (15)$$

где R — газовая постоянная (равна $8,315 \text{ Дж} \cdot \text{К}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$), T — абсолютная температура, F — количество электричества, равное 1 фарадею (96 500 Кл). Перейдя к десятичным логарифмам, найдем значение предлогарифмического множителя в уравнении (15), если температура 30°C :

$$\frac{8,315 \cdot 303 \cdot 2,303}{2 \cdot 96\,500} = 0,03$$

$$\text{следовательно, } -E = 0,03 \lg [H_2]_B \text{ (вольт)} \quad (16)$$

Это выражение справедливо, когда А — нормальный водородный электрод и $[H^+]$ для электрода В равна 1 (1 г-экв./л). Если давление H_2 для электрода В равно 1 атм, а $[H^+] < 1 \text{ г-экв./л}$, электроны будут двигаться от электрода В к электроду А, произойдет обращение электродных реакций, а электродный потенциал на электроде В определится выражением

$$E = \frac{RT}{F} \ln [H^+]_B$$

Производя подстановку, как выше, и переходя к десятичным логарифмам, получаем

$$E = 0,06 \lg [H^+]_B$$

или

$$-E = 0,06 \text{ рН}_B \quad (17)$$

Объединяя оба выражения, получаем формулу для разности потенциалов между нормальным водородным электродом и водородным электродом в любом другом разбавленном водном растворе

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{[H^+]}{[H_2]^{1/2}} \quad (18)$$

$$E = \frac{RT}{F} \ln [H^+] - \frac{RT}{2F} \ln [H_2] \quad (19)$$

При 30°C формула (19) запишется следующим образом:

$$E = 0,03 \lg \frac{1}{[H_2]} - 0,06 \text{ рН} \quad (20)$$

Если $[H_2]$ поддерживается постоянной при каком-либо заданном давлении, можно провести потенциометрические измерения рН. Если же рН известно, можно определить давление водорода.

Поскольку окисление органического соединения осуществляется путем отщуждения водорода, то можно принять, что в растворе такого соединения должно «развиваться» очень небольшое, трудно поддающееся измерению давление водорода. Различные красители могут восстанавливаться газообразным водородом в присутствии соответствующего катализатора, например платиновой черни; например, реакция с восстановленной формой метиленового синего (MbH_2) выглядит так:



Отсюда следует, что в растворе восстановленного красителя количество водорода должно соответствовать небольшому, но вполне реальному давлению (можно измерить либо инертным электродом, либо рассчитать по расходу какого-нибудь другого вещества, пошедшего на восстановление). Для этой реакции

$$K = \frac{[\text{Mb}][\text{H}_2]}{[\text{MbH}_2]} \quad \text{и} \quad [\text{H}_2] = \frac{K[\text{MbH}_2]}{[\text{Mb}]}$$

т. е. давление водорода, находящегося в такой равновесной системе зависит от относительных количеств восстановленной и окисленной форм красителя; потенциал инертного электрода в этой системе соответствует потенциалу водородного электрода при данном давлении водорода и изменяется в зависимости от рН, как для любого другого водородного электрода.

Поэтому можно заменить $[\text{H}_2]$ в уравнении (19):

$$[\text{H}_2] = K \frac{[\text{восстановитель}]}{[\text{окислитель}]}$$

так что

$$E = \frac{RT}{F} \ln [\text{H}^+] - \frac{RT}{2F} \ln K \frac{[\text{восстановитель}]}{[\text{окислитель}]} \quad (21)$$

или

$$E = \frac{RT}{F} \ln [\text{H}^+] - \frac{RT}{2F} \ln K + \frac{RT}{2F} \ln \frac{[\text{окислитель}]}{[\text{восстановитель}]} \quad (22)$$

Для любой системы $(RT/2F)\ln K$ должно быть постоянной величиной, и если измерения проводятся в среде с высокой буферной емкостью, то и $(RT/F)\ln [\text{H}^+]$ поддерживается постоянным; тогда эти два выражения можно объединить в новую постоянную E'_0 . В общем случае в реакциях переноса на одну молекулу приходится

один или более электронов. Обозначим число перенесенных электронов на один моль n , тогда можно записать

$$E = E'_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{окислитель}]}{[\text{восстановитель}]} \quad (23)$$

При 30 °С это выражение упрощается:

$$E = E'_0 + \frac{0,06}{n} \lg \frac{[\text{окислитель}]}{[\text{восстановитель}]} \quad (24)$$

Таким образом, E'_0 — потенциал окислительно-восстановительной системы, если превращение прошло наполовину, при некоторых определенных рН и температуре, так как при отношении $[\text{окислитель}]/[\text{восстановитель}] = 1$ второе слагаемое в уравнении (24) равно нулю. Символ E_m иногда употребляется для обозначения среднеточечного потенциала окислительно-восстановительной пары в какой-либо специфической среде, например в цитоплазме клеток печени.

Окислительно-восстановительный потенциал E данного раствора [уравнение (24)] в таком случае есть электронное давление, которое этот раствор оказывает на инертный электрод и которое может быть измерено с помощью потенциометра. Если вернуться к рассмотрению простейшего примера диссоциации водорода на протоны и электроны, то станет очевидным, что такой раствор также должен оказывать *протонное давление*. Протоны не могут легко «течь» по проводам, и нет никакого простого инструментального устройства, позволяющего провести *прямое* измерение протонного давления. Вместо этого применяется электрометрическое измерение рН, описанное выше и представляющее собой измерение эффектов варьирующего протонного давления на электронное давление; регистрация последнего и позволяет вычислить рН. Таким образом, рН раствора выражает его протонное давление точно так же, как E — электронное давление. Подобно тому как система, состоящая из кислоты и ее соли, противодействует изменениям рН или забуферивает данный раствор, система, состоящая из окислителя и восстановителя, «забуферивает» раствор и противодействует изменениям окислительно-восстановительного потенциала E .

В табл. 10.1 указаны значения E'_0 для некоторых систем, представляющих биологический интерес. Система обозначает здесь смесь окисленной и восстановленной форм данного вещества, например хинона и гидрохинона, пирувата и лактата и т. д. Из уравнения (20) можно видеть, что из двух систем с одинаковым рН система с более отрицательным потенциалом является более сильным восстановительным агентом, поскольку ей соответствует более высокое равновесное давление водорода.

Окисленный компонент способен восстанавливаться другим компонентом системы с более отрицательным E'_0 . Согласно урав-

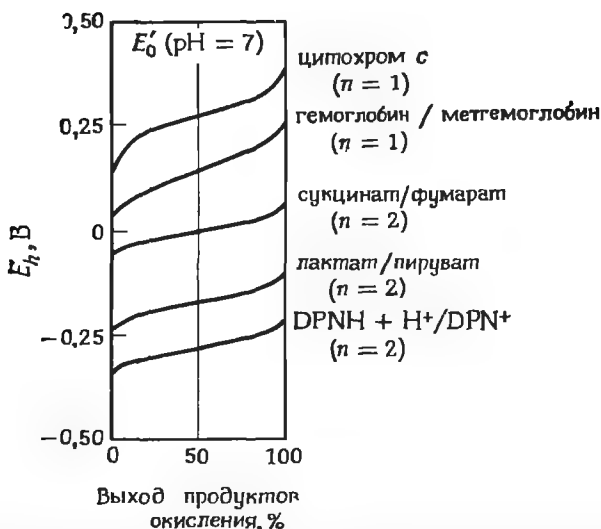


Рис. 10.2. Кривые потенциометрического титрования. E_h — наблюдаемая разность потенциалов (в вольтах); n — число перенесенных электронов на 1 моль окисленного вещества.

нению (20), раствор на 0,03 В более отрицательный, чем другой раствор, обладает в 10 раз более высоким водородным давлением. При смешении двух растворов с различными потенциалами реакция может протекать до тех пор, пока не устанавливается равновесие; потенциал конечного раствора лежит внутри интервала, ограниченного потенциалами двух первоначально взятых растворов. Таким образом, если раствор, содержащий вещество А и его восстановленную форму AH_2 , смешивается с раствором, содержащим В и BH_2 , реакция будет проходить до тех пор, пока системы не приобретут одинаковый потенциал, т. е.

$$E'_0(B) + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[B]}{[BH_2]} = E'_0(A) + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[A]}{[AH_2]}$$

и

$$E'_0(B) - E'_0(A) = \frac{RT}{nF} \ln \frac{[A]}{[AH_2]} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[B]}{[BH_2]}$$

Откуда следует, что

$$\Delta E'_0 = \frac{RT}{nF} \ln \frac{[A][BH_2]}{[B][AH_2]} \quad (25)$$

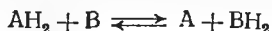
Таким образом, разность потенциалов между начальными растворами определяет относительное количество каждого реагента при состоянии равновесия, или, другими словами, степень прохождения

реакции. Ход такой реакции может контролироваться с помощью титрования, аналогичного ацидиметрии. Вместо индикатора, например фенолфталеина, меняющего свой цвет в зависимости от кислотности среды, в раствор добавляют небольшое количество красителя, цвет которого зависит от степени его окисления, например небольшое количество метиленового синего. И тот и другой тип титрования можно контролировать с помощью одних и тех же потенциометра и электрода. При ацидиметрии изменения потенциала регистрируются как изменения $[H^+]$; в окислительно-восстановительных реакциях потенциал меняется в зависимости от колебаний водородного или электронного «давления». Типичные кривые титрования приведены на рис. 10.2. Отметьте сходство этих кривых и кривых, получаемых в ацидиметрических титрованиях (изменение pH); оно становится понятным, если учесть сходство между выражением (24) и уравнением Хендерсона — Хассельбаха (разд. 4.3.1.1).

10.2.5. Энергетические соотношения для окислительно-восстановительных реакций

Поскольку интерес к окислительно-восстановительным реакциям связан в основном с тем, что они поставляют энергию, следует рассмотреть некоторые количественные отношения, связывающие эти реакции и изменения энергии.

Если восстановленная форма одной системы смешивается с окисленной формой другой, реакция протекает согласно уравнению



Для этой реакции изменение стандартной свободной энергии (в калориях на моль) можно вычислить из равновесных данных обычным способом. Пусть K — константа равновесия:

$$K = \frac{[A][BH_2]}{[AH_2][B]} \quad (26)$$

Успехи экспериментальных определений константы равновесия K , разумеется, зависят от разработки соответствующих методов анализа различных компонентов системы. Когда разность потенциалов $\Delta E'_0$ между двумя реагирующими системами велика, равновесие может быть настолько сильно сдвинуто в одну сторону, что точное определение конечной концентрации AH_2 и B становится невозможным. Однако изменение свободной энергии, обусловленное реакцией, может быть вычислено, если известны потенциалы двух реагирующих систем. Подставив в уравнение (25) выражение для K , согласно уравнению (26), получаем

$$\Delta E'_0 = \frac{RT}{nF} \ln K \quad (27)$$

или

$$nF\Delta E'_0 = RT \ln K$$

Поскольку $-\Delta G^\circ = RT \ln K$ (разд. 10.1.1), то

$$-\Delta G^\circ = nF\Delta E'_0 \quad (28)$$

где ΔG° — стандартная свободная энергия реакции; n — число электронов (или атомов водорода), участвующих в реакции; F — число Фарадея; $\Delta E'_0$ — разность между значениями E'_0 двух систем. Размерность произведения $F\Delta E'_0$ — кулон·вольт или джоуль; для перевода в единицы тепловой энергии следует использовать соотношение $4,18 \text{ Дж} = 1 \text{ кал}$. При $n=1$ ΔG° соответствует окислению 1 моля восстановителя. Рассмотрим в качестве примера окисление малата до оксалоацетата цитохромом *c* в условиях, когда поддерживаются постоянными эквимольные концентрации каждого из реагентов двух систем. Так как E'_0 соответственно равны $-0,17$ и $0,2 \text{ В}$ (табл. 10.1), то

$$\Delta G' = -nF\Delta E'_0 = \frac{-2 \cdot 96\,500 \cdot [0,2 - (-0,17)]}{4,18} = -18\,246 \text{ кал}$$

При окислении 1 моля яблочной кислоты цитохромом *c* в этих условиях освобождается 18 246 кал, которые в физиологических условиях могут быть использованы для совершения полезной работы. Если бы яблочная кислота окислялась молекулярным кислородом, освободалось бы 45 715 кал, так как E'_0 для восстановления кислорода с образованием воды равно $+0,82 \text{ В}$.

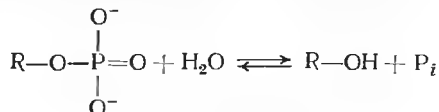
В динамическом стационарном состоянии живой клетки концентрации каждого из компонентов любой окислительно-восстановительной системы поддерживаются постоянными; это относится и к рассмотренной в качестве примера системе, т. е. к концентрациям малата, оксалоацетата и окисленной и восстановленной форме цитохрома *c*. Однако концентрации окисленных и восстановленных форм компонентов окислительно-восстановительной пары редко бывают одинаковыми. Следовательно, действительное значение ΔE для данной реакции может существенно отличаться от $\Delta E'_0$; это значение можно рассчитать из уравнения (26):

$$\Delta E = \left(E'_0 + \frac{0,06}{n} \lg \frac{[A]}{[AH_2]} \right) - \left(E'_0 + \frac{0,06}{n} \lg \frac{[B]}{[BH_2]} \right)$$

10.3. Высокоэнергетические фосфаты

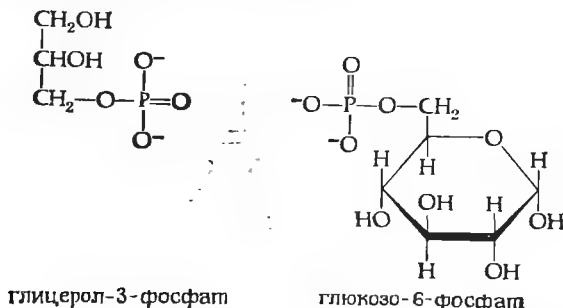
Как уже отмечалось ранее, в клетках имеются механизмы, посредством которых свободная энергия, освобождающаяся в результате окислительно-восстановительных реакций, может быть использована для осуществления эндергонических процессов. В основном это совершается путем запасаания этой энергии в форме особого класса соединений, большинство из которых является ангидридами фосфорной кислоты.

В биологических системах изменение стандартной свободной энергии, сопряженное с гидролизом различных фосфатных производных, ограничено интервалом от -2000 до $-13\,000$ кал/моль.

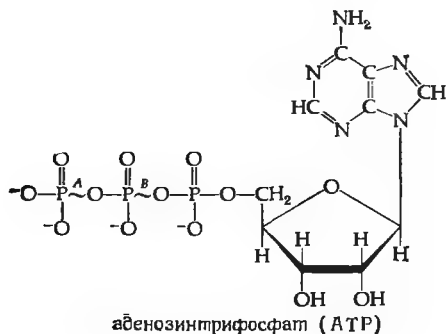


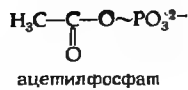
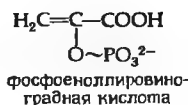
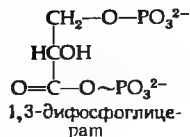
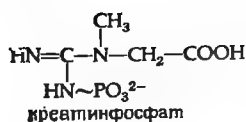
$$K = \frac{[\text{ROH}][\text{P}_i]}{[\text{ROPO}_3^{2-}]}$$

где P_i — смесь HPO_4^{2-} и H_2PO_4^- , которая имеется в рассматриваемой системе при данном значении pH. Для H_2PO_4^- $\text{p}K_a = 6,8$. Более низкие значения (от -2000 до -5000 кал/моль) наблюдаются для обычных сложных эфиров, среди которых типичными являются глицерол-3-фосфат и глюкозо-6-фосфат.



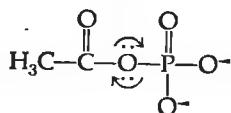
Множество эфиров этого типа участвует в промежуточных стадиях метаболизма. Меньшую группу составляют органические фосфаты, гидролиз которых сопровождается изменением свободной энергии ΔG° от -5000 до $-13\,000$ кал/моль. Ниже приведены примеры таких высокоэнергетических фосфатсодержащих соединений:





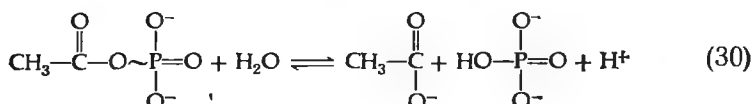
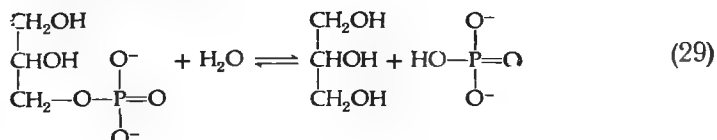
Известно несколько классов высокоэнергетических фосфатов: кислотные ангидриды, фосфорные эфиры енолов и производные фосфамовой кислоты $\text{R}-\text{NH}-\text{PO}_3\text{H}$. Гидролиз фосфоенолпирувата относится к процессам с наиболее высокими значениями свободной энергии ($-13\,000$ кал/моль при 25°C) по сравнению с гидролизом всех известных в природе высокоэнергетических фосфатных соединений. Принято знаком $\sim$ обозначать связь, гидролиз которой сопровождается освобождением большого количества свободной энергии. Относительно высокая потенциальная энергия, освобождаемая при гидролизе, обусловлена свойствами всей структуры фосфатного соединения, т. е. не только $\sim\text{P}$ -связью, которая разрывается при гидролизе.

Существует несколько факторов, которые вносят свой вклад в процесс освобождения больших количеств свободной энергии, сопряженный с гидролизом этой группы соединений. В некоторых соединениях, например ангидридах, способность фосфорильной группы оттягивать электрон делает электрофильный карбонильный атом углерода ацильной группы менее стабильным. Кроме того, энергия резонанса продуктов гидролиза может существенно превышать энергию резонанса высокоэнергетического соединения. Об этом свидетельствует тот факт, что число резонансных форм для (креатин+фосфат) значительно превышает число резонансных форм креатинфосфата; число резонансных форм для (ион ацетата+ P_i) также превышает их число в ацетилфосфате. В принципе чем больше число возможных резонансных форм, тем выше стабильность системы. Об этом свидетельствует, например, тот факт, что π -электроны кислорода, связывающего ацетил и фосфат в ацетилфосфате, не могут одновременно удовлетворять потребности в электронах карбонильной и фосфорильной группы.



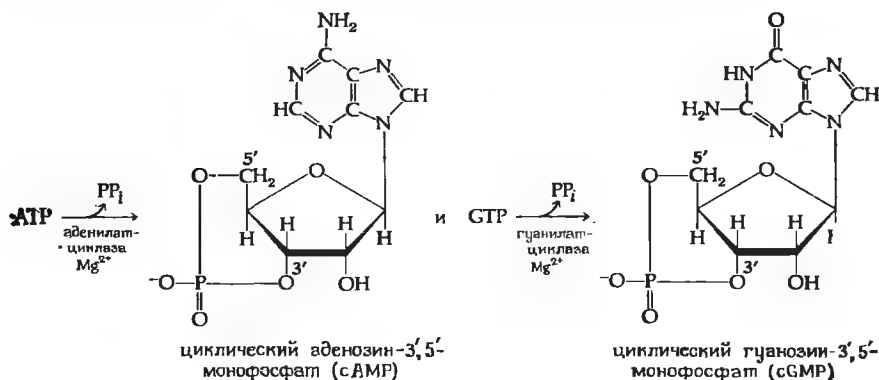
Обсуждаемые явления особенно очевидны для фосфоенолпирувата. Кроме того, гидролиз многих компонентов этой группы при $\text{pH } 7$

приводит к увеличению заряда. Это видно из сравнения гидролиза глицерол- и ацетилфосфата:



Как можно видеть, гидролиз 1 моля ацетилфосфата приводит к освобождению одного протона. Связывание этого протона забуференной средой вносит большой вклад в общее изменение свободной энергии, сдвигая реакцию вправо.

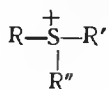
Два высокоэнергетических соединения, обнаруженные практически во всех клетках,— это циклические нуклеотиды, а именно циклический 3',5'-аденозинмонофосфат (сАМР) и циклический 3',5'-гуанозинмонофосфат (сГМР). Каждый из них синтезируется из соответствующего рибонуклеозидтрифосфата (АТР или ГТР) в реакции, катализируемой ферментами, связанными с плазматической мембраной,— *аденилатциклазой* и *гуанилатциклазой*.



Вероятно, высокая свободная энергия гидролиза циклических нуклеотидов ($\Delta G^\circ = -11\,900$ кал/моль) отражает напряженность их ангидридной структуры. Быстрое удаление PP_i присутствующей повсюду неорганической пирофосфатазой (см. ниже) предотвращает обратимость гидролитической реакции и делает возможным образование сАМР и сГМР. Важность этих соединений состоит,

однако, не в их высокоэнергетическом характере, а в той регуляторной роли, которую сАМР и сГМР играют в метаболизме, что будет неоднократно обосновываться в последующих главах.

В живых системах обнаружены и другие высокоэнергетические соединения, гидролиз которых сопровождается изменением свободной энергии в интервале от -6000 до $-11\,000$ кал/моль. Особенно примечательны ацилтиоэфиры $R-CO-S-R'$, к которым относятся СоА-производные жирных кислот (разд. 17.5). Богатство энергией этих соединений в основном объясняется запретами резонанса, вызванными слабым взаимодействием между π -электронами $S-S$ -мостика и карбонильной группой. Это явление усиливается в ацетоацетилтиоэфирах, так как они имеют электрофильную терминальную ацильную группу. Другие высокоэнергетические классы соединений включают аминокислотные эфиры рибозной единицы нуклеиновых кислот (гл. 25), а также сульфониевые соединения с общей структурой



S-Аденозилметионин (гл. 22) — одно из таких соединений. Другая группа высокоэнергетических соединений включает ацильные эфиры карнитина (разд. 17.4.5), которые играют важную роль в транспорте жирных кислот через митохондриальные мембраны. В этом случае высокая свободная энергия гидролиза ацилэфирной связи, вероятно, объясняется близостью положительно заряженного четвертичного атома азота.

В табл. 10.2 приведены изменения свободной энергии, обусловленные гидролизом различных соединений, представляющих биологический интерес.

Причина уникального биологического достоинства фосфатных эфиров заключается в том, что фосфат придает кинетическую стабильность термодинамически лабильным молекулам, а также в том, что превращения этих молекул могут происходить только при участии специфических ферментов. Так, несмотря на то что ΔG° гидролиза уксусного ангидрида, ацетилфосфата и неорганического пирофосфата близки, эти соединения стабильны в воде несколько секунд, несколько часов или несколько лет соответственно. Стабильность АТФ в воде позволяет клетке использовать энергию окисления для проведения эндергонических реакций, поскольку гидролиз АТФ был бы расточительным и бесцельным с точки зрения экономики энергии.

Следует отметить, что изменения свободной энергии, приведенные выше, представляют собой ΔG° , т. е. относятся к условиям стандартного состояния каждого реагента. Действительное изменение свободной энергии для реагентов в биологической системе, если их состояние поддерживается близким к стационарному

Таблица 10.2
Свободная энергия гидролиза некоторых соединений,
представляющих биологический интерес

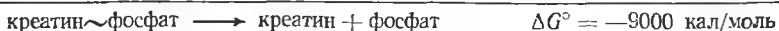
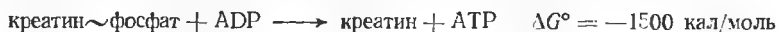
Соединение	$-\Delta G^0$ (при pH 7), кал/моль	Соединение	$-\Delta G^0$ (при pH 7), кал/моль
Ацетиладенилат (ацетил-АМР)	13 300	Пальмитилкарнитин	7 700
Фосфоенолпироват	13 000	Уридиндифосфатглюкоза	7 600
Циклический АМР	11 900	Сахароза	6 600
Ацетилфосфат	10 500	Фосфодиэфиры	6 000
Ацетоацетил-СоА	10 500	Глюкозо-1-фосфат	5 000
S-Аденозилметионин	10 000	Этилацетат	4 900
Фосфокреатин	9 000	Аланилглицин	4 000
Этилглицинат	8 500	Глутамин	3 400
АТР, внутренняя связь (В)	8 500	Глицерол-3-фосфат	3 000
АТР, терминальная связь (А)	8 400	Лактоза	3 000
Ацетил-СоА	7 700	Пептидная связь (внут- ренняя, только в боль- шом полипептиде)	500

$([c] \cdot [d] \neq [a] \cdot [b])$ описывается уравнением

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[c][d]}{[a][b]}$$

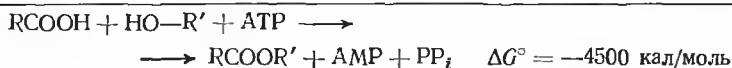
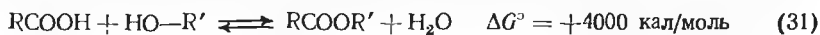
Тогда истинное значение ΔG может существенно отличаться от ΔG^0 (быть ниже или выше).

Как описано ниже (разд. 14.4), явление переноса фосфата и участия фосфата в метаболических процессах было обнаружено при исследовании брожения дрожжевых экстрактов. Многочисленные опыты по изучению метаболизма в сокращающейся мышце показали, что в анаэробных условиях энергия для сокращения каким-то образом поставляется гликолизом — процессом, при котором гликоген превращается в молочную кислоту (гл. 14). Однако сокращение происходит и в мышцах, отравленных нодациетатом — ингибитором, предотвращающим гликолиз. Далее, эти мышцы продолжают сокращаться до тех пор, пока содержащийся в них креатинфосфат не превращается полностью в креатин и P_i . Затем было показано, что ферментная система, катализирующая эту реакцию в мышцах, действует только в присутствии адениннуклеотидов; процесс в целом был описан следующим образом:

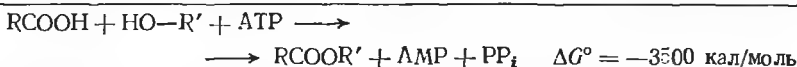
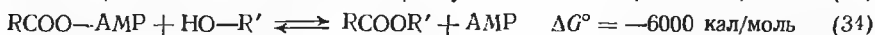
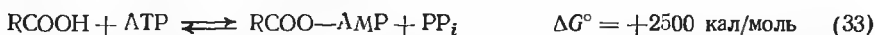


Таким образом, оказалось, что реакция, в которой «гидролизуется» АТР, служит непосредственным источником энергии для процесса мышечного сокращения. Это представление в дальнейшем было расширено, и в настоящее время АТР рассматривается как *прямой источник энергии для большинства эндергонических биологических систем*.

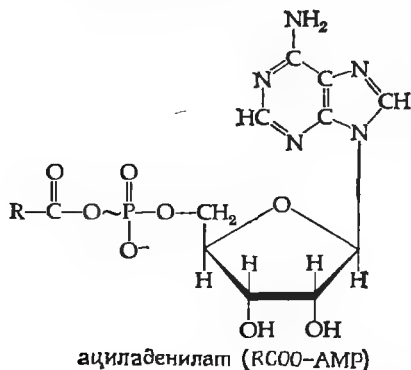
Обратимся теперь к механизму, при помощи которого экзергоническая реакция может заставлять идти эндергонический процесс. Рассмотрим синтез сложного эфира и гидролиз АТР до АМР и РР_i:



В обычных (лабораторных) условиях реакция (32) не могла бы влиять на реакцию (31), которая не протекает в отсутствие требуемых 4000 кал/моль. Энергия, освобождаемая в реакции (32), может использоваться для протекания реакции (31), если обе реакции сопряжены посредством общего промежуточного продукта, как в следующем гипотетическом случае:



Промежуточный продукт — RCOO—АМР представляет собой смешанный ангидрид карбоновой кислоты и фосфата адениловой кислоты.



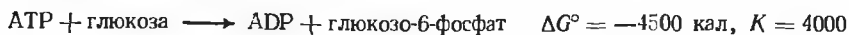
Существует множество примеров таких реакций в метаболизме (см., например, разд. 12.2.1 и 17.5).

Гидролиз двух ангидридных связей АТР протекает с фактически одинаковыми изменениями в свободной энергии. При образовании ациладенилата происходит разрыв связи между пирофосфатными и аденилатными единицами АТР. Таким образом, пирофосфат, а не ортофосфат оказывается конечным продуктом. Относительно малое изменение ΔG говорит о том, что синтез органического эфира по этому механизму возможен, но не является предпочтительным. Однако в пользу возможности этого синтеза свидетельствуют дополнительные соображения. Пирофосфат в основном гидролизует до ортофосфата под действием неорганических *пирофосфатаз*, присутствующих во всех клетках. ΔG° гидролиза пирофосфата составляет -7000 кал. Соответственно гидролиз пирофосфата, образующегося в ходе последовательных реакций, необходим для синтеза сложного эфира, фактически делает эту реакцию необратимой. В качестве примера процессов, в которых гидролиз пирофосфата придает необратимый характер обратимому в иных условиях процессу, можно привести синтез нуклеотидов, полинуклеотидов, пептидных связей, S-аденозилметионина и активацию жирных кислот. Все эти процессы обсуждаются в других главах этой части книги. Однако некоторые микроорганизмы обнаруживают слабую пирофосфатазную активность или ее полное отсутствие. Вместо этого они используют PP_i в качестве фосфорилирующего субстрата, заменяющего АТР. Например, *Entamoeba histolytica* содержит ферменты (киназы), которые используют PP_i для фосфорилирования фруктозо-6-фосфата, фосфоенолпирувата, ацетата и др. Степень распространения этих реакций у млекопитающих неясна.

Ферменты, катализирующие перенос фосфата от АТР к акцептору, называются *киназами*; их можно разделить на две категории. Киназы, катализирующие перенос между высокоэнергетическими фосфатными соединениями, могут легко действовать в обоих направлениях; именно так они и ведут себя в метаболизме, например

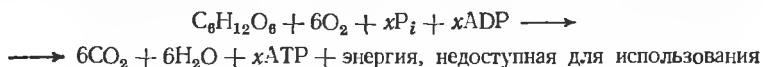


Можно ожидать, что перенос фосфата с образованием относительно низкоэнергетических соединений протекает в основном только в прямом направлении, например



На основе этих фактов строится основная концепция: для того чтобы обеспечить энергией эндергонические биологические процессы, дыхательный процесс должен быть каким-то образом сопряжен

с синтезом АТР. Последний является «разменной монетой» в метаболических превращениях энергии. Уравнение, описывающее процесс окисления глюкозы в целом, можно теперь представить как



Доля суммарной ΔG при окислении глюкозы или другого метаболического топлива, используемая для синтеза АТР, позволяет судить об истинной эффективности процесса клеточного дыхания, целью которого является снабжение энергией эндергонических процессов. ΔG° синтеза АТР составляет около $+8400$ кал/моль. В физиологических условиях истинное значение ΔG превышает $+12000$ кал/моль. Так как для полного окисления 1 моля глюкозы $\Delta G^\circ = -686000$ кал, этот процесс может потенциально дать энергию для синтеза ~ 50 молей АТР из АДФ и P_i (в гл. 12 показано, что действительный результат составляет 38 молей АТР на 1 моль глюкозы). Если при окислении молекулы глюкозы образуется 38 молекул АТР, то весь процесс окисления должен быть разделен на много более мелких стадий. О том, как это происходит, говорится в гл. 12.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

- .Bray H. G., White K., Kinetics and Thermodynamics in Biochemistry, 2d ed., Academic Press, Inc., New York, 1966.
- Ingram D. J. E., Free Radicals as Studied by Electron Spin Resonance, Academic Press, Inc., New York, 1958.
- Klotz I. M., Energy Changes in Biochemical Reactions, Academic Press, Inc., New York, 1967.
- Lehninger A. L., Bioenergetics. 2d ed., W. A. Benjamin, Inc., New York, 1972.
- Singer T. P., ed., Biological Oxidations, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1967.

Обзорные статьи

- .Bock R. M., Adenine Nucleotides and Properties of Pyrophosphate Compounds, in: P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback, eds., The Enzymes, 2d ed., vol. II, pp. 3—38, Academic Press, Inc., New York, 1960.
- Ennor A. H., Morrison J. F., Biochemistry of the Phosphagens and Related Guanidines, Physiol. Rev., 38, 631—674, 1958.
- .George P., Griffith S. J., Electron Transfer and Enzyme Catalysis, in: P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback, eds., The Enzymes, 2d ed., vol. I, pp. 347—390, Academic Press, Inc., New York, 1959.
- .George P., Rutman R. J., The High Energy Phosphate Bond Concept, in: J. A. V. Butler, B. Katz, eds., Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry, vol. X, pp. 1—53, Pergamon Press, New York, 1960.

- Huennkens F. M., Whiteley H. R.*, Phosphoric Acid Anhydrides and Other Energy-rich Compounds, in: M. Florkin, H. S. Mason, eds., Comparative Biochemistry, vol. I, pp. 107—180, Academic Press, Inc., New York, 1960.
- Ingraham L. L., Pardee A. B.*, Free Energy and Entropy in Metabolism, in: D. M. Greenberg, ed., Metabolic Pathways, 3d ed., vol. I, pp. 2—46, Academic Press, Inc., New York, 1967.
- Lipmann F.*, Biosynthetic Mechanisms, Harvey Lect., 44, 99—123, 1948—1949.
- Michaelis L.*, Fundamentals of Oxidation and Reduction, in: D. E. Green, ed., Currents in Biochemical Research, pp. 207—227, Interscience Publishers, Inc., New York, 1946.
- Pullman B., Pullman A.*, Electronic Structure of Energy-rich Phosphates, Radiat. Res., Suppl. 2, pp. 160—181, 1960.

Глава 11

ОБЩИЕ АСПЕКТЫ МЕТАБОЛИЗМА

Потребность в энергии. Механизмы регуляции.

Структура и функция клетки.

*Экспериментальные подходы к изучению
метаболизма*

В живых организмах, находящихся в процессе постоянного контакта и обмена с окружающей средой, происходят непрерывные химические изменения, составляющие их метаболизм. Представление о масштабе метаболических процессов и их направлениях может быть составлено путем всеобъемлющего рассмотрения метаболизма микроорганизмов и человека.

Число клеток в бактериальной культуре, например *E. coli*, может удваиваться каждые 20 мин в простой среде, содержащей только глюкозу и неорганические соли. Компоненты среды постепенно истощаются, но лишь немного выделяется в среду растущей бактериальной культурой. Любая клетка в норме содержит набор из ~ 2500 различных белков, каждый из которых представлен ~ 400 молекулами, а также ~ 1000 видов органических соединений и разнообразных нуклеиновых кислот, присутствующих в количестве 10^7 — $3 \cdot 10^8$ молекул. Очевидно, что эти клетки участвовали в грандиозном биосинтетическом «спектакле», в котором полный синтез каждого клеточного компонента происходит со скоростью, обеспечивающей гармонический рост клеток и исключающей сколько-нибудь значительное перепроизводство или недопроизводство какого-либо компонента.

Не менее сильное впечатление производит метаболизм взрослого человека, который сохраняет неизменную массу в течение ~ 40 лет; хотя за это время человек потребляет ~ 6 т твердой пищи и 37 850 л воды, масса и состав тела остаются постоянными.

Клетки млекопитающих характеризуются динамическим стационарным состоянием. Каждая клетка постоянно занята изготовлением из материалов окружающей среды сложной смеси аминокислот, жирных кислот и их многочисленных производных, стероидов, моно- и полисахаридов, пуринов и пиримидинов, нуклеотидов, нуклеиновых кислот и белков. В то же время клетка разрушает эти полимеры посредством гидролиза, окисляет углеводы и жирные кислоты для того, чтобы получить энергию. Кроме того, становится очевидным, что все эти многообразные метаболические процес-

сы и дающие энергию реакции, благодаря которым становятся возможными эти процессы, подчиняются тонкому контролю.

Это метаболическое совершенство как простых, так и более сложных организмов сохраняется даже при столкновении с разрушительными воздействиями окружающей среды. Способность организма поддерживать нормальное, постоянное внутреннее состояние, называемое *гомеостазом*, одновременно выполняя многочисленные сложные метаболические реакции и невзирая на значительные изменения в окружающей его среде, объясняется чувствительностью специфических регуляторных механизмов. В самом деле, неспособность одного или нескольких таких механизмов функционировать нормально ведет к метаболическим отклонениям, лежащим в основе различных заболеваний.

Для понимания метаболизма должны быть известными химия участвующих молекул (метаболитов), реакции, в которые они вступают, ферменты, катализирующие эти реакции, и регуляторные механизмы, определяющие скорости последовательных катализируемых ферментами реакций, в которых каждый данный метаболит А превращается в другой метаболит В. Совокупность таких последовательных стадий составляет *метаболический путь*, а из разнообразных метаболических путей и их совместного функционирования складывается *метаболизм*.

В данной главе рассмотрены некоторые общие сведения о потребности в энергии и продуцировании энергии в ходе метаболизма, выявлены главные особенности метаболических регуляторных процессов, обсуждены общие черты клеточной структуры и функции (этот вопрос развит в последующих главах), а также дано краткое описание имеющихся в распоряжении средств, позволяющих проводить изучение метаболических процессов.

11.1. Потребности в энергии

Преобразование энергии обязательно сопутствует химическим реакциям, делающим возможным движение, дыхание, воспроизведение, рост, реакцию на возбуждение — все характерные свойства, отличающие живые клетки от неживых структур. Энергия, вырабатываемая в ходе метаболизма в целом, освобождаемая при всех химических превращениях в организме животного и получаемая в конечном итоге за счет окисления пищевых веществ, должна реализоваться или в виде тепла, или в виде механической работы. Даже в процессе мышечной деятельности основная часть энергии рассеивается как тепловая, что объясняется относительной неэффективностью мышц как механических устройств. Во время отдыха практически вся эта энергия выделяется в виде тепла.

В последующих главах подробно обсуждается, каким образом скорость биологических окислительно-восстановительных реакций в норме отрегулирована так, чтобы количество освобождающейся свободной энергии ΔG соответствовало потребностям в энергии для выполнения полезной работы. Формы этой работы многообразны. Живые клетки являются эффективными преобразователями потенциальной химической энергии в другие формы энергии, а именно в химическую, механическую, электрическую, осмотическую и у некоторых организмов даже в электромагнитную энергию (свет). Так, свободная энергия, получаемая при окислении глюкозы, может использоваться для синтеза белков, жирных кислот, нуклеиновых кислот или стероидов; для сократительной деятельности мышц, проведения нервного импульса или генерации электрического заряда; для выделения богатой низкомолекулярными соединениями мочи или для поддержания большого концентрационного градиента ионов Na^+ и K^+ внутри и снаружи клеток, а также, как, например у светлячка, для генерации световой энергии.

Многие из этих процессов характерны для среднего взрослого человека, имеющего массу, например, 70 кг; каждые 24 ч в его организме генерируется и освобождается ~ 2000 ккал. Поскольку на протяжении указанного периода времени существенно не изменяются ни масса тела, ни его структура и состав, вся эта энергия, за исключением того количества, которое потребовалось для выполнения физической работы, например поднятия тяжестей и т. д., выделяется в виде тепла (даже если в организме и имели место какие-то промежуточные превращения). В связи с тем, что энергия, теряемая в виде тепла, необратимо рассеивается в окружающей среде, существует постоянная потребность в ежедневном обеспечении новыми внешними источниками энергии, т. е. в питательных веществах, которые могут быть окислены. Весь процесс, который, между прочим, обеспечивает организм теплом, необходимым для поддержания температуры тела на уровне $< 37^\circ\text{C}$, не является непроизводительным, как это может показаться. Именно благодаря совокупности процессов, реализуемых в результате непрерывного использования свободной энергии окислительно-восстановительных реакций и ее преобразования, становится возможным существование высокоупорядоченных структур и витальные проявления живого организма.

11.1.1. Калорийность питательных веществ

При исследованиях метаболизма человека принято пользоваться килокалорией (1 ккал = 1000 кал), означающей количество тепла, требуемое для нагревания 1000 г воды от 15 до 16°C . Количество энергии, выделяющееся при окислении химических соединений, в том числе и компонентов пищи, может быть измерено в ка-

лориметрической бомбе. Суммарная энергия ΔH , освобождающаяся при какой-либо химической реакции (разд. 10.1), не зависит от механизма этой реакции. ΔH реакции



не зависит и от места ее протекания (в калориметрической бомбе или в живом организме).

Впервые экспериментальные определения количества тепла, выделяемого при окислении веществ, содержащихся в пище, вне тела в калориметрической бомбе проведены Рубнером; он также сопоставил полученные результаты с данными прямого измерения теплопродукции собаки, помещенной в калориметр и затем получившей известные количества углеводов, белков или жиров. Для углеводов и жиров данные оказались близкими независимо от того, «сгорало» ли вещество внутри или вне тела. Однако для белка величина теплопродукции *in vivo* (4,1 ккал/г) оказалась меньшей, чем в калориметрической бомбе (5,3 ккал/г). Это отличие объясняется тем, что азот белков в физиологических условиях не окисляется, а в основном выделяется в форме мочевины.

Поскольку углеводы, липиды и белки продуктов питания включают моно- и полисахариды, жирные кислоты с короткой и длинной цепью, насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты и т. д., калорийность каждого из индивидуальных компонентов различна. Так, глюкоза при окислении выделяет 3,75 ккал/г, в то время как гликоген 4,3 ккал/г. Животные белки более калорийны, чем растительные; большинство животных липидов освобождает 9,5 ккал/г, а масло и свиное сало 9,2 ккал/г. Поэтому калорийность всех трех классов веществ, содержащихся в пище, указывается в виде средних значений: 4,1, 9,3 и 4,1 ккал/г для углеводов, липидов и белков соответственно. Если допускать возможность неполного переваривания и/или всасывания, эти значения можно округлить до целых; тогда калорийность углеводов, липидов и белков равна 4, 9 и 4 соответственно.

Прием пищи вызывает увеличение теплопродукции по сравнению с нормальным основным уровнем (отдых, послеобеденное состояние). Это увеличение происходит сразу после принятия пищи и может быть обусловлено перевариванием и всасыванием веществ пищи. Дополнительная теплопродукция может возникнуть в результате последующих метаболических превращений абсорбированных продуктов.

Прием белков вызывает самое большое увеличение теплопродукции. Этот эффект, называемый *специфическим динамическим действием*, объясняется выделением организмом дополнительного обусловленного приемом пищи количества тепла сверх основного уровня теплопродукции. При приеме белка специфическое динамическое действие составляет $\sim 30\%$, углевода — 6% , а липида —

4% энергетической ценности принятой пищи. Так, прием 25 г белка, что эквивалентно 100 ккал, дает 30 ккал дополнительной теплопродукции сверх основного уровня. Эти калории растрачиваются в виде тепла. Только 70 ккал потенциально полезной энергии может быть получено из этих 25 г белка. При расчете калорийности диеты важно учитывать специфическое динамическое действие.

Дополнительная освобождающаяся энергия при метаболизме питательных веществ в печени, очевидно, связана главным образом с их специфическим динамическим действием.

Поскольку живые организмы подчиняются первому закону термодинамики, равновесие, устанавливающееся между количеством принятых калорий и потреблением энергии, являясь основным фактором, определяющим при нормальных условиях, набирается или теряется масса тела в данный период времени. Увеличение массы в связи с метаболизмом липидов обсуждается в гл. 18. Сведения о ежедневной потребности человека в калориях представлены в гл. 49.

11.1.2. Основной метаболизм

Невозможно оценить энергетические соотношения, имеющие место в некоторый заданный момент метаболизма между питательными веществами, теплопродукцией, метаболической энергией и запасаемой энергией. Однако соотношение между принятой пищей и теплопродукцией как результатом работы можно определить. Это достигается посредством измерений энергетического обмена в постабсорбционный период и в состоянии отдыха, когда использование энергии, связанной с работой, сведено к минимуму. В этих контролируемых условиях теплопродукция становится основным путем потери энергии телом, а запасенная энергия может быть единственным источником этого тепла. Поскольку энергия не может быть ни создана, ни уничтожена, уменьшение количества запасенной энергии становится равным потере тепла и измерение этой потери позволяет оценить метаболизм в целом. Это измерение, сделанное в постабсорбционный период и в условиях отдыха, характеризует собой *основной метаболизм*; иными словами, данные этого измерения отражают энергетические потребности тех клеточных и тканевых процессов, которые связаны с постоянными проявлениями жизнедеятельности организма — метаболической активностью мышц, мозга, почек, печени и других клеток — плюс тепло, освобождаемое в результате механической работы при сокращении мышц, участвующих в процессах дыхания, кровообращения и перистальтики. На основной метаболизм приходится ~50% всей расходуемой энергии, требуемой для разнообразных процессов жизнедеятельности в течение обычных суток для индивидуумов, ведущих относительно малоподвижный образ жизни. *Скорость ос-*

нового метаболизма (СОМ) не характеризует минимальный уровень метаболизма, необходимого лишь для поддержания жизни, так как во время сна скорость метаболизма может быть ниже скорости основного метаболизма.

Зная объем потребляемого индивидуумом кислорода, приведенного к нормальным условиям, можно вычислить теплопродукцию, поскольку известно, что калорический эквивалент 1 л O_2 составляет 4,825 при дыхательном коэффициенте (см. ниже), равном 0,82.

Основной метаболизм обычно выражают в килокалориях в час (ккал/ч). На практике скорость основного метаболизма определяют за период 10—15 мин и относят к 1 м² поверхности тела или стандартному значению (в процентах).

11.1.2.1. Факторы, влияющие на основной метаболизм

Основной метаболизм довольно постоянен у каждого данного индивидуума и у близких индивидуумов одного и того же вида. Многие факторы влияют на основной метаболизм, в том числе размеры тела, возраст, пол, климат, пища, занятия спортом, прием лекарств и т. д. Основной метаболизм может отклоняться от нормы в разнообразных патологических состояниях, и в некоторых случаях измерение основного метаболизма является полезным диагностическим инструментом.

Существуют четыре важных фактора, определяющих масштабы потерь тепла организмом: во-первых, разность температур окружающей среды и организма; во-вторых, природа поверхности, излучающей тепло; в-третьих, площадь этой поверхности и, в-четвертых, теплопроводность среды. В условиях определения основного метаболизма главным фактором из числа приведенных выше является площадь поверхности, и при близких физиологических условиях основной обмен различных млекопитающих пропорционален площади поверхности. Несмотря на то что *теплопродукция, отнесенная к 1 кг массы тела*, может широко варьировать для различных видов и связана *обратной зависимостью с массой тела*, *теплопродукция, отнесенная к 1 м² поверхности*, почти без исключения постоянна.

11.1.3. Дыхательный коэффициент

Выделение тепла при метаболизме является следствием полного окисления питательных веществ атмосферным O_2 с образованием CO_2 . Масштаб и природа такого газообмена варьируют в зависимости от характера продукта питания или смеси питательных веществ, подвергающихся окислению. Теоретическое соотношение между потреблением O_2 и выделением CO_2 можно рассчитать по стехиометрическим уравнениям окисления углевода, липида или

белка соответственно. Молярное отношение выделенного CO_2 к потребленному O_2 называется *дыхательным коэффициентом (ДК)*. Для всех углеводов ДК равен 1. Для липидов среднее значение ДК равно 0,70 ($\text{ДК} < 1$, поскольку жирные кислоты характеризуются высокой степенью насыщенности в сравнении с углеводами). Поэтому при окислении липидов должно потребляться больше O_2 , чем при окислении углеводов. При голодании, когда энергия производится почти исключительно за счет резерва калорий в форме депонированных липидов, ДК достигает 0,71. Обратно, когда наступает интенсивное превращение углеводов в липиды, ДК может даже превосходить 1,0. Среднее значение ДК для белка составляет 0,80.

11.1.4. Общие черты последовательных реакций метаболизма

1. Синтез компонентов, необходимых для жизни клетки, таких, как аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды и стероиды, осуществляется с помощью серии специфических последовательных ферментативных реакций, называемых *последовательностью* или *путем*. Для каждого пути исходным материалом служит одно из веществ, возникающих в метаболизме «вездесущих» углеводов или жирных кислот.

2. Для того чтобы выработать какое-либо вещество, нужное клетке, метаболический путь должен быть по существу необратимым, т. е. сопровождаться значительным освобождением свободной энергии. Хотя путь может включать несколько обратимых реакций, протекание процесса в целом лишь в одном направлении фактически определяется необратимыми стадиями.

3. Известно множество примеров, когда два метаболита физиологически могут взаимопревращаться. Почти во всех тех случаях, которые имеют физиологическое значение, например когда в организме существует потребность для превращения метаболита А в метаболит В и в другое время В в А, такое превращение становится возможным в последовательностях, полностью или частично независимых (рис. 11.1), причем каждая из них в итоге характеризуется большим отрицательным значением ΔG . Если эти две последовательности к тому же независимо контролируются, то каждая может быть использована для различных метаболических функций.

4. В каждом метаболическом пути имеется *пусковая стадия*, т. е. реакция образования первого метаболита, который может не играть никакой иной роли в метаболизме, кроме как служить промежуточным продуктом в биосинтезе конечного продукта последовательности, как, например, в последовательности $\text{с} \rightarrow \text{I}$ (рис. 11.2). В большинстве случаев пусковая стадия происходит с большой потерей свободной энергии, так что реакция по существу необ-

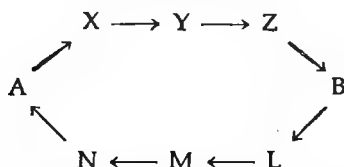


Рис. 11.1. Независимые последовательности реакции превращения метаболитов А в В и В в А.

ратима. Очевидно, что метаболический контроль, направленный на ограничение образования конечного продукта, реализовался бы наиболее успешно при условии подчинения ему пусковой стадии. Ингибирование процесса на стадиях дальнейших последовательностей могло бы привести к накоплению промежуточных продуктов, таких, как l, m или n, которые не имеют иных ролей в метаболизме и могут быть даже вредными для клетки, если концентрация их существенно возрастает. Кроме того, синтез ненужных веществ может сопровождаться расходом энергии.

Контроль пусковой стадии является почти неизменным атрибутом метаболизма, контроль промежуточных стадий осуществляется реже. Хотя все пять типов регуляции, которые перечислены ниже, известны в ферментативных системах млекопитающих, многие данные о них получены при изучении бактерий. Бактерии легко поддаются исследованию контрольных механизмов, и у них обнаружены различные последовательности, которые не встречаются у млекопитающих, такие, как синтез всех α-аминокислот, присутствующих в белках. Более того, метаболизм бактерий характеризуется преобладанием синтетической активности, что связано с относительно коротким временем жизни их популяций. Однако исследования метаболизма млекопитающих выявляют все возрастающее число контрольных механизмов, и представляется вероятным, что последовательности всех метаболических реакций управляются таким образом. Вероятно также, что многие метаболические болезни есть не что иное, как отклонения в функционировании тонких контрольных механизмов. Генетическая недостаточность фермента

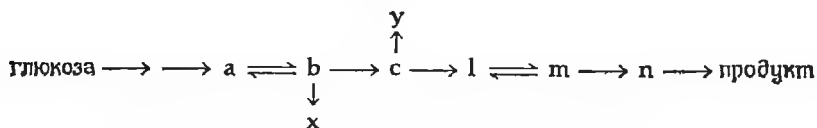


Рис. 11.2. Схема пути синтеза от глюкозы к конечному продукту. а, б и с — промежуточные продукты метаболизма глюкозы, общие для многих метаболических путей. Реакция $c \rightarrow l$ — пусковая стадия, поскольку l, m и n — промежуточные продукты, не выполняющие никакой иной метаболической роли, кроме того что они служат в качестве предшественников конечного продукта пути.

делает невозможным процесс, за который этот фермент ответствен; это отсутствие фермента организм может выдержать только в случае сравнительно второстепенных по своему значению метаболических процессов. Полная невозможность осуществления каких-либо кардинальных процессов метаболизма несовместима с жизнью. И напротив, какой-либо дефект в регуляции центрального метаболического процесса может проявляться в форме заболевания.

11.2. Механизмы регуляции метаболизма

Каждая отдельная реакция протекает со скоростью, соизмеримой с потребностями клетки, идет ли речь о синтезе кофермента, сложного липида для клеточной мембраны, нуклеиновой кислоты или белка или о запасании энергии, необходимой для этих разнообразных эндергонических активностей. Обычно такие процессы происходят с существенно различными скоростями, соответствующими той индивидуальной роли, которую каждый процесс играет в жизни клетки. Эти специфические скорости определяются *регуляторными* или *контрольными механизмами*, пять видов которых заслуживают внимания.

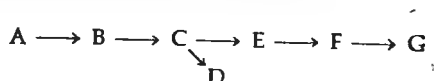
Регуляция скорости поступления метаболитов в клетку. Лишь немногие вещества, подобно воде, свободно проникают мембраны посредством простой диффузии. На перенос веществ через мембрану влияют процессы двух типов. Концентрация многих растворимых метаболитов с низкой молекулярной массой выше в клетках, чем во внеклеточной крови или лимфе. Поэтому поступление таких метаболитов в клетки требует их переноса против концентрационного градиента. *Активный транспорт*, стало быть, представляет собой процесс с положительной ΔG , для протекания которого требуется энергия в виде АТФ. В других случаях перемещаемый материал движется внутрь по концентрационному градиенту, т. е. ΔG отрицательна. Однако возможность такого *пассивного транспорта* обычно обусловлена специфическими механизмами мембраны (см. ниже). Эти транспортные системы не только обеспечивают постоянство внутриклеточного состава, но и принимают участие в процессах транспорта веществ через мембраны внутриклеточных органелл, например митохондрий (гл. 12). Ниже обсуждаются специфические аспекты транспортных процессов.

Действие других регуляторных механизмов связано с влиянием либо на количество данного фермента в клетке, либо на каталитическую активность ($V_{\max}$ или K_m) уже присутствующих молекул фермента. В общем случае внутриклеточные концентрации различных ферментов, грубо говоря, пропорциональны скорости, с которой протекают реакции. Так, ферменты, обуславливающие возмож-

ность окисления глюкозы, присутствуют в гораздо большей концентрации, чем те, которые катализируют синтез коферментов.

Подавление синтеза ферментов конечным продуктом метаболической последовательности (разд. 11.1.4). Это явление представляет собой грубый контроль метаболизма. Так, например, синтез ферментов, необходимых для образования гистидина, подавляется в присутствии гистидина в среде бактериальной культуры. Вновь образовавшиеся клетки, следовательно, будут содержать уменьшающиеся количества этих ферментов, но ферменты, присутствующие в клетках изначально, в то время когда добавляли гистидин, продолжают функционировать и разрушаются медленно или не разрушаются вообще. Подобно этому, в метаболических последовательностях млекопитающих в присутствии репрессоров может потребоваться несколько дней для того, чтобы уровень ферментативной активности существенно снизился в результате продолжительного разрушения самого фермента.

Интересная проблема возникает в связи с регуляцией разветвленных метаболических путей, которые приводят к синтезу нескольких нужных продуктов, например



где D, E и G могут быть полезными конечными продуктами. Как показали наблюдения, в бактериях эта проблема решается по-разному. Так, для стадии $B \longrightarrow C$ может существовать несколько генетически независимых ферментов, которые подавляются при накоплении достаточных концентраций продуктов D, E и G соответственно. Эта стадия может катализироваться одним ферментом, который подавляется одним из указанных продуктов, и другим, который не подавляется ни одним из них.

Индукция одного или более ферментов субстратами. В бактериях этот процесс обычно происходит очень быстро и может совершаться спустя несколько минут после добавления субстрата в среду с культурой микроорганизма. Механизм этого явления в микроорганизмах подробно обсуждается в гл. 26. У млекопитающих подобное явление индукции и увеличения концентраций специфического фермента происходит через несколько часов или суток в ответ на индуктор и представляет собой важный, но относительно грубый механизм метаболического контроля.

Модуляция активности уже присутствующего фермента может служить в качестве тонкого контрольного механизма для регуляции метаболических процессов, так как представляет возможность

для мгновенного ответа на изменение внутриклеточной среды. Ингибирование по типу обратной связи фермента, ответственного за пусковую стадию в данном пути, продуктом этого пути представляет собой наиболее общую форму контроля процессов биосинтеза. Препимущества, которые дает клетке такая саморегуляция, очевидны. Аллостерическая регуляция скоростей ферментативных реакций рассматривалась ранее (гл. 8). Особое значение для понимания этого явления имеет типичная сигмоидная кривая кинетики процесса, устанавливающая связь между скоростью реакции и концентрацией субстрата или эффектора (рис. 8.13), поскольку при низкой концентрации очевиден незначительный эффект на скорость процесса, тогда как в области средней концентрации ниже насыщения относительно небольшие изменения концентрации приводят к существенным изменениям в скорости. Следовательно, аллостерический контроль по типу обратной связи может служить в качестве эффективного регуляторного механизма. Увеличение активности уже присутствующего фермента, предоставляет еще одно средство контроля над скоростями метаболических процессов. Так, вещества, называемые положительными эффекторами, увеличивают специфические ферментативные активности (ср. гл. 14). Активация или инактивация фермента также может быть вызвана ковалентной модификацией, например фосфорилированием или аденилированием. Примеры механизмов увеличения и модуляции активности фермента встречаются в последующих главах.

Стимуляция метаболитом ферментов, которые функционируют в путях, приводящих к использованию этого метаболита. Этот тип метаболического контроля наблюдался в клетках млекопитающих, а также в бактериальных клетках.

В последующих главах приведено много примеров участия таких контрольных механизмов в регуляции метаболизма.

11.2.1. Регуляция клеточного метаболизма внеклеточными агентами

Каждый из вышеописанных общих регуляторных механизмов эффективен на клеточном или субклеточном уровнях. Однако в многоклеточном организме животного одна группа клеток, например клетки печени, может вырабатывать какое-нибудь соединение, которое затем используется в другом месте, например в скелетной мышце. Если «предложение» регулируется «спросом», то продуцирующим вещество клеткам необходима информация относительно метаболического состояния клеток-«потребителей». Получение этой информации обеспечивается ее «химическими носителями», например гормонами (часть пятая), нейромедиаторами (гл. 37) и другими вырабатываемыми клеткой медиаторами, например прос-

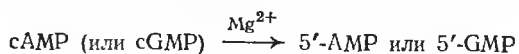
тагландинами (гл. 19), способными передавать свои «сигналы» клеткам, в которых они не образуются. При достижении клетки-«мишени» внеклеточные сигналы преобразуются, вызывая определенные внутриклеточные процессы. Это преобразование происходит посредством взаимодействия носителя информации со специфическим рецептором в клетке-«мишени» и вызывает активацию связанных с мембраной и/или внутриклеточных ферментов, в результате которой увеличивается синтез соединений, служащих в качестве вторичных носителей информации.

Описаны два вторичных носителя информации с четкими характеристиками, являющиеся циклическими нуклеотидами: циклический аденозин-3',5'-монофосфат (сАМР) и циклический гуанозин-3',5'-монофосфат (сGMP). Синтез этих нуклеотидов в реакциях, катализируемых специфическими связанными с мембраной циклазами, описан в предыдущей главе (разд. 10.3).

В общем случае, как оказалось, внутриклеточные концентрации сАМР и сGMP претерпевают противоположно направленные изменения в ответ на один и тот же стимул. Так, делению клеток обычно предшествует увеличение внутриклеточной концентрации сGMP, в то время как увеличение синтеза сАМР, как правило, ингибирует деление и рост клеток. Несмотря на то что часто измеряют концентрации только либо того, либо другого циклического нуклеотида, для физиологической функции оказывается более важным *отношение* этих концентраций, поскольку, как полагают, каждый из указанных циклических нуклеотидов является активатором различных типов протеинкиназ (см. ниже).

Роль циклических нуклеотидов в регуляции метаболических процессов описана в нескольких последующих главах.

Внутриклеточные концентрации [сАМР] и [сGMP] регулируются также второй группой ферментов — цикло-нуклеотид-фосфодиэстеразами, которые катализируют инактивацию сАМР и сGMP посредством гидролиза до 5'-АМР и 5'-GMP соответственно.



Концентрация сАМР в (сырых) тканях животных составляет 0,1—1,0 мкмоль/кг.

Свободный сАМР, вероятно, имеет короткий период полупревращения, что объясняется эффективностью действия и высокой активностью сАМР-фосфодиэстеразы. Концентрация сАМР в скелетной мышце кролика в состоянии покоя составляет от 0,2 до 0,3 мкмоль/л, т. е. приблизительно столько, сколько требуется для достижения 50% максимальной активности сАМР-зависимой протеинкиназы (см. ниже). Таким образом, изменения в концентрации сАМР регулируют активность протеинкиназы.

Протеинкиназы связывают сАМР и сGMP с клеточным метаболизмом. Эти киназы катализируют перенос γ -фосфата АТР к гидроксидным группам серина или треонина разнообразных акцепторных белков, включающих гликогенсинтазу (разд. 15.3.8), киназу фосфорилазы *b* (разд. 15.3.8), рибосомные белки (гл. 26), гистоны (гл. 26), а также мембранные белки субклеточных органелл, таких, как митохондрии (гл. 12). Изменение активности ферментов в результате фосфорилирования в действительности и есть тот метаболический процесс регуляции, который осуществляется по сигналу, полученному после связывания регуляторного агента с мембранными рецепторами. Неферментные субстраты протеинкиназ, например рибосомные белки и гистоны, могут проявлять свое влияние посредством других механизмов, а именно через реакции, воздействующие на скорости синтеза специфических белков (гл. 25 и 41).

Многие протеинкиназы — это внутриклеточные ферменты, находящиеся в цитозоле. Однако установлено, что как киназная активность, так и субстрат локализуются на внешней плазматической мембране адипоцитов, фибробластов и трансформированных вирусом клеток млекопитающих. Локализация киназы и ее белкового субстрата в мембране может обеспечить действие механизма фосфорилирования и дефосфорилирования при взаимодействии клетки с ее окружением.

Вспомним, что протеинкиназы являются аллостерическими ферментами, содержащими два типа субъединиц — каталитическую С и регуляторную R (гл. 8). Комплекс CR каталитически неактивен. Когда аллостерический модулятор, например сАМР, связывается со специфическим центром на R, это сопровождается диссоциацией CR и образованием комплекса R—сАМР и свободной каталитической активной субъединицы С.

Была проведена полная или частичная очистка сАМР-зависимых протеинкиназ из ряда тканей. Очищенная протеинкиназа из сердца быка (мол. масса 280 000) состоит из каталитических субъединиц (мол. масса 42 000) и регуляторных субъединиц (мол. масса 55 000). Нативной формой фермента, по-видимому, является R_4C_2 . Эта киназа катализирует внутримолекулярную реакцию, в которой до 2 молекул P_i переносится на серильные остатки в связывающем сАМР белковом (R) димере холофермента. Фосфорилирование R влияет на скорость реассоциации R и С (каталитическая субъединица киназы, см. разд. 8.7.2.2). Дефосфо-R реассоциирует в 5—8 раз быстрее, чем фосфо-R. Дефосфорилирование R катализируется *фосфопроteidфосфатазой*, которая действует на фосфорилированный белок, связывающий сАМР (R), но не на фосфорилированный холофермент. Эти наблюдения говорят о том, что активность определенных протеинкиназ зависит от процессов фосфорилирования и дефосфорилирования, что составляет важный

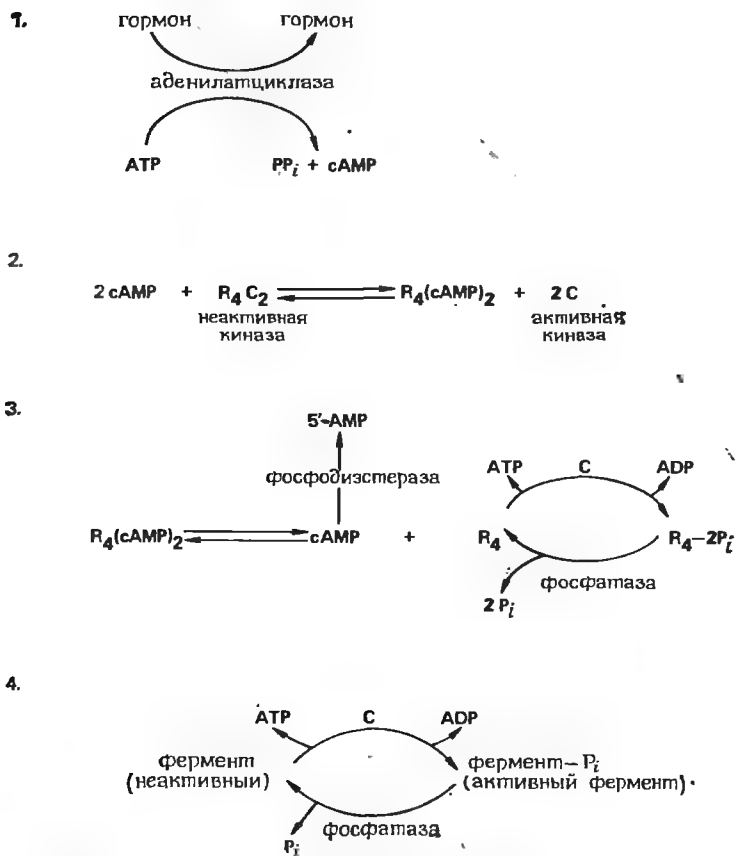


Рис. 11.3. Схематическое изображение реакций, следующих за связыванием гормона с клеткой-мишенью. R₄-2P_i — фосфорилированная форма регуляторной субъединицы протеинкиназы, фермент P_i — активный фосфорилированный фермент (ср. с. 279).

регуляторный механизм для ряда ферментов. Некоторые из этих ферментов обсуждаются в последующих главах. Киназа из скелетной мышцы описывалась ранее (гл. 8).

Зависимая от cGMP протеинкиназа из легких быка была очищена до гомогенности. Поскольку фермент (мол. масса 150 000) состоит из субъединиц одинаковой молекулярной массы, то cGMP-зависимая протеинкиназа должна существенно отличаться от cAMP-зависимых протеинкиназ, состоящих из не сходных между собой cAMP-акцепторных и каталитических киназных субъединиц.

В большинстве тканей млекопитающих в цитозоле клеток присутствуют две cAMP-зависимые протеинкиназы — изоферменты ти-

па I и II. Так, в печени описаны две различные киназы с одинаковым коэффициентом седиментации 6,8 S, но с неидентичными каталитическими субъединицами, которые можно дифференцировать посредством изоэлектрического фокусирования. В некоторых тканях, например в мышце кролика, удалось разделить четыре различные сАМР-зависимые протеинкиназы.

Два термостабильных белка, выделенных из сердца собаки, модулируют активность протеинкиназы. Один стимулирует активность сGMP-зависимой протеинкиназы, а другой ингибирует сАМР-зависимую протеинкиназу. Недавно были описаны дополнительные модуляторы активности этих киназ и внутриклеточной концентрации циклических нуклеотидов. Высокоочищенный термостабильный Ca^{2+} -связывающий фосфопроteid из мозга активирует как аденилциклазу, так и циклонуклеотид — фосфодиэстеразу.

На рис. 11.3 приведены схемы описанных ранее реакций (разд. 11.2.1), посредством которых внеклеточный сигнал может быть переведен на язык внутриклеточных процессов путем изменений внутриклеточной [сАМР] и модуляции активности сАМР-зависимых протеинкиназ. Подобный механизм может регулировать внутриклеточную [сGMP] и активность сGMP-зависимых протеинкиназ.

Циклические нуклеотиды найдены у всех видов животных, которые подвергались исследованию, в бактериях и других одноклеточных организмах, но не были обнаружены в высших растениях.

11.3. Основные черты структуры и функции клетки

Основываясь на информации, полученной с помощью световой, фазово-контрастной и электронной микроскопии, гистохимических и цитохимических методов, а также при разрушении и разделении клеток на фракции (разд. 11.4.2.2), и сопоставляя ее с результатами физических и химических исследований субклеточных компонентов, удалось достичь более глубокого понимания специфических функций, которые выполняют в жизни клетки субклеточные органеллы. На рис. 11.4 представлена электронная микрофотография главных органелл гепатоцита крысы.

Гепатоцит крысы, достигающий 20 мкм в диаметре, имеет объем цитоплазмы $\sim 5000 \text{ мкм}^3$ и объем ядра $\sim 1/10$ — $1/20$ объема цитоплазмы. Митохондрии в норме занимают 15—20% объема цитоплазмы, пероксисомы 1—2%, лизосомы 0,2—0,5%. Объем эндоплазматической сети (ЭС) нельзя измерить из-за исключительно неправильной формы. Так или иначе, поверхность мембран этой сети может достигать 25 000 мкм² для шероховатой ЭС и 15 000—20 000 мкм² для гладкой ЭС. Каждый гепатоцит содержит ~ 1000 —2000 митохондрий, а также ~ 500 пероксисом и вдвое



Рис. 11.4. На этой электронной микрофотографии малого увеличения показан общий вид крысинного гепатоцита. При более сильном увеличении можно наблюдать детали структуры оргanelл. В — желчный каналец и MV — микроворсинка на поверхности лакуны. Некоторые микроворсинки вблизи MV разрезали так, что они кажутся не связанными с клеткой. GL — плотные отложения, скопления гранул гликогена. М — митохондрии, N — ядро, Nu — ядрышко, P — пероксисомы, L — лизосомы, G — аппарат Гольджи и S — межклеточное пространство, отделяющее эту клетку от соседнего гепатоцита. E — эндоплазматическая сеть. $\times 25\,000$. (Любезно предоставлен д-ром А. Б. Новиковым.)

меньше (~ 250) лизосом. В нем также имеются несколько миллионов рибосом, одна пара центриолей, большое, но точно неизвестное количество микротрубочек и микрофиламентов.

11.3.1. Плазматическая мембрана

Клетка млекопитающего заключена в оболочку — плазматическую мембрану, которая составляет значительную часть ее общей массы и до известной степени определяет ее форму. Мембрана является не только барьером между клеткой и внешней средой, но представляет собой работающее устройство, обеспечивающее относительное постоянство состава внутриклеточного объема. Наряду с этим плазматическая мембрана содержит специфические рецепторы для внешних возбудителей, присутствием которых могут объясняться такие разнообразные ответы, как ориентированное движение клетки (*хемотаксис*), стимуляция связанных в мембране ферментов, например вышеописанных циклаз, или генерация сигналов, которые могут быть химическими, например сАМР и сGMP, или электрическими, как в нервах (гл. 37). Плазматическая мембрана также является местом расположения специфических для клетки антигенов (гл. 29), которые во многих случаях характерны как для данного типа клеток, так и для вида млекопитающего в целом. Белки и специфические ферменты, связанные с транспортом ионов и метаболитов через мембранный барьер, тоже локализованы в этой структуре (см. ниже).

Благодаря инвагинациям плазматическая мембрана может образовывать единое целое с протяженными каналами, которые «вводят» окружающую среду далеко «внутри» клетки и участвуют в формировании пространства между внутренней и внешней мембранами ядра. Эта система каналов находится в постоянной взаимосвязи с внеклеточным окружением. Некоторые другие внутриклеточные мембранные структуры (эндоплазматическая сеть) обладают общими с плазматической мембраной основными физическими свойствами. Микроворсинки (многочисленные, очень маленькие инвагинации) наблюдаются в мембранах клеток почечных канальцев (обращены в просвет канальца), в кишечном эпителии (обращены в просвет кишки) и в печени (обращены в желчные протоки).

Плазматические мембраны представляют собой двухслойные структуры толщиной от 6 до 10 нм. Белки и липиды, основные компоненты мембраны, обычно находятся в соотношении 1 : 1, но в некоторых случаях, например в миелине (гл. 37), концентрация липида может превышать концентрацию белка. Главные мембранные липиды — это фосфоглицериды, гликолипиды и холестерин. Белки, в основном представленные гликопротеидами, целесообразно разделить на два вида: *периферические* и *интегральные*. Первый термин используется для обозначения тех гликопротеидов, которые

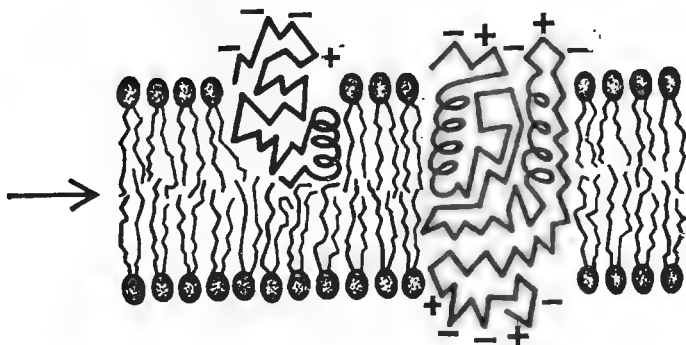


Рис. 11.5. Мозаичная модель структуры мембраны, поясняющая расположение липидов и глобулярных белков (поперечный срез). Фосфолипиды изображены в виде прерывистого бислоя; их ионные и полярные головки находятся в контакте с водой. Некоторое количество липидов может структурно отличаться от основной массы липидов, но это на рисунке не показано. Интегральные белки, сложные полипептидные цепи которых обозначены толстыми линиями, показаны в виде глобулярных молекул, частично погруженных в мембрану и частично выступающих из нее. На поверхности выступающих участков располагаются ионные остатки (— и +) белка, а неполярные остатки в основном находятся в погруженных участках. Степень погружения интегральных белков, и в особенности их способность пронизывать всю толщу мембраны, зависит от размера и структуры молекул. Стрелка показывает поверхность расщепления мембраны, которая, вероятно, возникает при криоскальвании экспериментальных образцов. [Singer and S. J., Nicolson G. L., Science, 175, 720, 1972; © 1972 by American Association for Advancement of Science.]

легко экстрагируются из плазматической мембраны водными не содержащими поверхностно-активных веществ (ПАВ) растворителями, в то время как интегральные гликопротеиды более тесно связаны с мембраной и легко могут быть солюбилизированы с помощью ПАВ, которые разрушают липидный бислой.

Обобщенная модель плазматической мембраны схематически показана на рис. 11.5. Хотя на рисунке липиды представлены только фосфолипидами, холестерин и гликолипиды также присутствуют в мембране. Липидный бислой асимметричен с точки зрения состава двух его частей (слоев), т. е. наружная часть отличается от внутренней, как об этом свидетельствуют ориентация транспортных систем (см. ниже) и локализация сахаридов на внешней поверхности. Так, в мембране эритроцита человека (гл. 32) сфингомиелин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин находятся преимущественно во внутренней части бислоя, а фосфатидилхолин — в наружной. Физиологические последствия такой асимметрии неясны, но возможно, что они выражаются в неодинаковой степени разжиженности каждого из монослоев. Кроме того, более высокая доля фосфолипидов, несущих отрицательный заряд, на

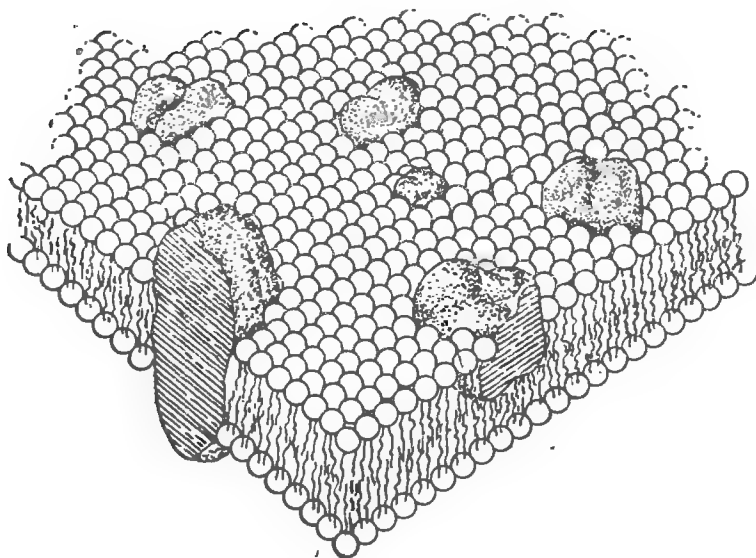


Рис. 11.6. Мозаичная модель структуры мембраны, показывающая расположение глобулярных белков в липидном матриксе (жидко-мозаичная модель); схематическое трехмерное изображение мембраны в разрезе. Массивные образования с заштрихованными поверхностями изображают глобулярные интегральные белки, которые беспорядочно и на больших расстояниях друг от друга распределены в плоскости мембраны. При близком соседстве некоторые, как показано, могут образовать специфические агрегаты. [Singer S. J., Nicolson G. L., Science, 175, 720, 1972; © 1972 by American Association for the Advancement of Science.]

внутренней стороне мембраны может облегчить ионные взаимодействия с компонентами, связанными в мембране и находящимися на ее поверхности.

Глобулярные белковые молекулы мембраны рассматриваются как структурно асимметричные. Подобно фосфоглицеридам, они также имеют одну полярную область и одну неполярную область (домен), которая и входит в жидкий липидный матрикс. В полярной области белковой глобулы, находящейся в контакте с водной фазой, собраны ионизованные остатки аминокислот и все ковалентно связанные углеводные остатки. В неполярной области отсутствуют ионизованные и углеводные остатки. Эта область белковой глобулы погружена в гидрофобную внутреннюю часть мембраны. Интегральные белки, «прошивающие» мембрану, закреплены таким образом, что их полярные участки обращены внутрь и наружу, а область их гидрофобного центра располагается между ними. На рис. 11.6 приведена схема поперечного разреза мембраны, построенная с учетом этой концепции.

Неотъемлемую часть обсуждения структуры мембраны, так же как и обсуждения структуры других органелл, составляет концепция самосборки (гл. 25). Если клетка должна располагать генетическими «инструкциями» для производства разнообразных белков, липидов, углеводов и т. д., то для формирования мембраны не требуется такого рода инструкций. Мембрана возникает в результате взаимодействия молекул определенной химической структуры. В самом деле, функциональный интегральный белок, добавленный в суспензию мембранных фосфолипидов, немедленно образует *везикулы* (*пузырьки*), в которых белок соответствующим образом погружен в липид, и все молекулы белка одинаково ориентированы, т. е. если белок является ферментом, его активный центр находится или снаружи, или внутри пузырька и активность проявляется в том случае, если субстрат расположен таким же образом.

Жидко-мозаичная структура мембран с некоторой латеральной подвижностью ее компонентов допускает осуществление физических или химических перестроек мембраны, которые могут оказать влияние на специфические мембранные компоненты или вызвать их изменение. В результате таких перестроек может произойти перераспределение мембранных компонентов посредством поступательной диффузии через вязкие двумерные растворы, что в свою очередь вызывает появление новых взаимодействий между подвергшимися изменению компонентами.

Множество явлений свидетельствует о справедливости концепции жидкоподобного состояния мембраны, которое зависит от природы жирнокислотных остатков, входящих в состав мембраны. Чем выше степень их ненасыщенности, тем сильнее выражена степень разжиженности мембраны. Насыщенные алифатические цепи и стерины вызывают повышение вязкости мембраны и ограничивают латеральное движение молекул белка в плоскости мембраны.

Мембранные белки могут также быть либо иммобилизованы, либо ограничены в подвижности в связи с присутствием связанных с внутренней поверхностью мембраны особых структурных образований — микрофиламентов и микротрубочек (см. ниже). Обнаружение этой роли цитоскелетных структур в латеральной подвижности молекул в мембране привело к модификации жидко-мозаичной модели мембранной структуры. Одна из таких моделей показана на рис. 11.7.

Предлагаются три дополнительных ограничительных механизма: во-первых, ассоциация или агрегация мембранных компонентов путем взаимодействий по горизонтали; во-вторых, закрепление мембранных компонентов в специфических липидных областях или исключение из них (выталкивание) и, в-третьих, ограничение подвижности периферическими мембранными компонентами на внут-

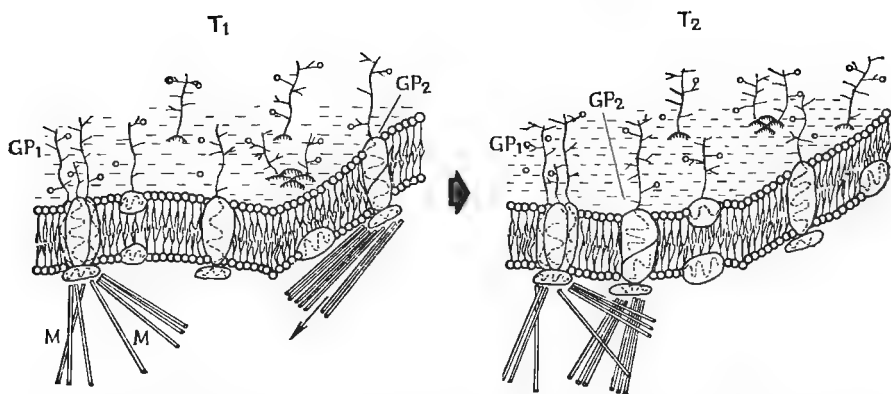


Рис. 11.7. Модифицированный вариант жидко-мозаичной модели структуры мембраны. T_1 и T_2 — различные моменты времени. Одни гипотетические интегральные гликопротеиды мембраны не сопряжены с другими компонентами и способны к латеральной диффузии в плоскости мембраны, образованной жидким бислоемным матриксом, а другие, как, например, интегральный гликопротеидный комплекс GP_2 , могут быть «заякорены» или их движение относительно затруднено цитоскелетным ансамблем M из микрофиламентов и микротрубочек. В определенных условиях некоторые интегральные мембранные комплексы GP_2 могут перемещаться с помощью связанных с мембраной цитоскелетных компонентов в ходе энергозависимого процесса. [Nicolson G. L., Biochim. Biophys. Acta, 457, 61, 1976.]

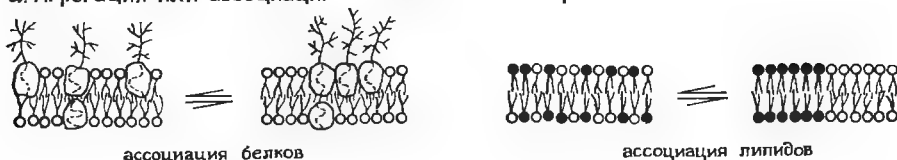
ренней или внешней мембраной поверхности. Некоторые механизмы, ограничивающие латеральную подвижность компонентов клеточной поверхности, изображены на рис. 11.8.

11.3.2. Основные черты явлений переноса

Процессы движения растворенных веществ через мембраны могут быть опосредованными или неопосредованными. Неопосредованный транспорт растворенного вещества представляет собой чисто физическую диффузию вещества вдоль его концентрационного градиента. Диффундирующая молекула во время прохождения через мембрану не модифицируется химически и не соединяется с другими видами молекул. Для опосредованных, или облегченных, мембранных транспортных процессов характерны кинетика насыщения (т. е. транспортная система может насыщаться транспортируемым растворенным веществом) и специфичность к транспортируемому веществу.

Возможность опосредованного транспорта обуславливается белками, способными обратимо связывать специфические субстраты. Эти транспортирующие молекулы белка имеют различные названия: *транспортные системы, переносчики, носители или транслокаторы*.

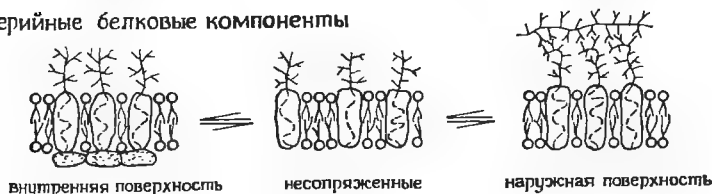
а. Агрегация или ассоциация в плоскости мембраны



б. Образование доменов



в. Периферийные белковые компоненты



г. Связанные с мембраной (цитоскелетные) компоненты

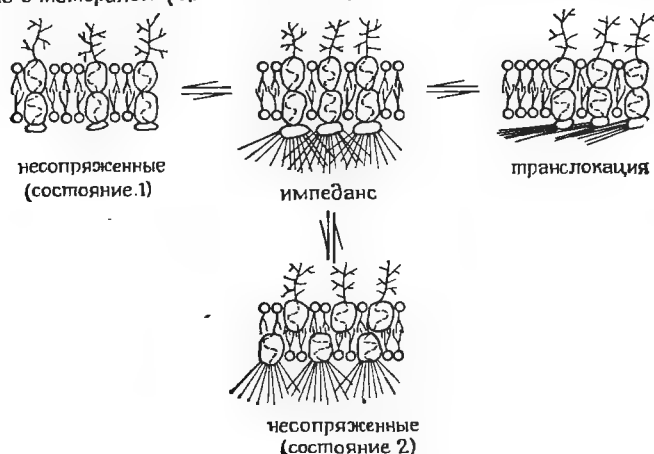


Рис. 11.8. Схематическое изображение некоторых возможных механизмов, ограничивающих латеральную подвижность рецепторов клеточной поверхности; *а* — ограничение в результате агрегации или связывания латерального движения либо белковых, либо липидных компонентов в плоскости мембраны; *б* — образование доменов, закрепление мембранных компонентов в специфических липидных доменах или выталкивание из них; *в* — возможная роль периферических мембранных компонентов, действующих либо на внутренней, либо на наружной поверхности мембраны и ограничивающих латеральное движение мембранных молекул; *г* — ограничение латеральной подвижности мембранных компонентов из-за влияния, которое могут оказывать на их транслокацию связанные с мембранной элементу цитоскелета. [Nicolson G. L., Biochim. Biophys. Acta, 457, 63, 1976.]

Облегченный транспорт относится к процессам, в которых соединение движется через мембрану только по определенным путям посредством способных к насыщению механизмов, не требующих непереносимого снабжения энергией за счет АТФ или равноценного источника. Таким процессом является вход глюкозы в гепатоциты, эритроциты и мышечные клетки по концентрационному градиенту.

Активным транспортом называют процессы, в которых молекула должна двигаться через мембрану независимо от направления ее концентрационного градиента. Энергия, необходимая для такого процесса, поставляется одним из двух следующих способов. Во-первых, транспорт данного метаболита может быть сопряжен с одновременным движением второго вещества, которое движется по своему концентрационному градиенту; ΔG этого процесса — большая и отрицательная величина. Вторая молекула может двигаться в том же направлении, что и первая (*симпорт*), или в противоположном направлении (*антипорт*). Во-вторых, энергия может поставляться сопряженным гидролизом АТФ (*АТРазная активность*) или какого-либо другого высокоэнергетического соединения на поверхности белка, который служит носителем. Такое «устройство» называется *насосом*.

Согласно теоретическим соображениям, для транспортного процесса необходимо, чтобы транспортирующие белки находились в мембране в форме агрегатов из близких по размеру двух или более полипептидных цепей (их размер должен соответствовать толщине мембраны). Предполагается, что вдоль центральной оси этого агрегата проходит наполненный водой канал. Если этот агрегат представляет собой димер из двух идентичных полипептидных цепей, он должен иметь ось симметрии, параллельную этому каналу, т. е. перпендикулярную плоскости мембраны. Активный центр, специфичный к транспортируемому лиганду, должен располагаться в полипептидной зоне внутри канала. При активном транспорте в одном из двух структурных состояний полипептидного агрегата активный центр обращен к водной фазе на одной стороне мембраны. Конформационное изменение полипептидной цепи, происходящее за счет поставляемой энергии, вероятно, позволяет связанному лиганду повернуться к другой стороне мембраны. Этот механизм находится в соответствии с концепцией фиксированных пор или каналов в плазматической мембране, образованных за счет специфической организации мембранных белков, а также согласуется с данными об асимметрии в расположении мембранных компонентов и о наличии белковых молекул, прошивающих всю толщину мембраны (см. выше).

При облегченной диффузии структурные состояния транспортного белка не отличаются существенно по энергии, и переход из состояния с более низкой энергией в состояние с более высокой

энергией может быть осуществлен за счет энергии, освобождающейся при связывании самого лиганда.

11.3.2.1. Аспекты активного транспорта

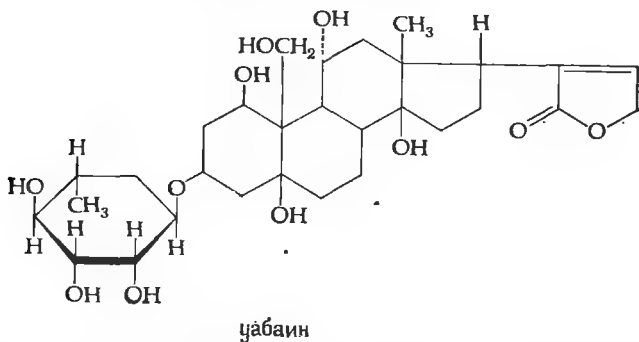
В тканях млекопитающих обнаружено несколько основных систем активного транспорта, таких, как натриевый и кальциевый насосы (Na^+ -насос и Ca^{2+} -насос), системы транспорта глюкозы и других сахаров и системы транспорта аминокислот. Наряду с этим высокоселективные транспортные системы, включающие специфические белковые переносчики, могут функционировать при переносе определенных ионов из внеклеточной во внутриклеточную среду. Примечательные примеры представляют собой участие апоферритина в регуляции передвижения железа из просвета кишечника в плазму крови (гл. 32) и активный транспорт анионов, опосредованный полипептидами, присутствующими в мембране эритроцита (гл. 32). Здесь кратко рассмотрена только первая система.

Na^+ -насос. В большинстве клеток животных внутриклеточная концентрация $[\text{K}^+]$ относительно высока и постоянна и составляет 120—160 ммоль/л, в то время как концентрация $[\text{Na}^+] < 10$ ммоль/л. Напротив, внеклеточная жидкость содержит относительно много ионов Na^+ ($[\text{Na}^+] \approx 150$ ммоль/л) и гораздо меньше ионов K^+ (обычно $[\text{K}^+] < 4$ ммоль/л). Поэтому на клеточных мембранах возникает значительный концентрационный градиент этих двух ионов. Постоянство высокой внутриклеточной концентрации $[\text{K}^+]$ поддерживается происходящим с затратой энергии выходом Na^+ из клетки с заменой его на K^+ .

Аналогия этого процесса с механическим насосом оправдана в том смысле, что энергия используется для движения ионов против препятствующего движению концентрационного градиента. Во всех исследованных случаях источником энергии для этой работы служит АТФ — субстрат для мембранной АТФазы. Так, в мембранах эритроцитов содержится АТФаза, для активации которой требуется Na^+ и K^+ . Фермент пространственно асимметричен, т. е. он стимулируется внеклеточным, а не внутриклеточным K^+ и внутриклеточным, а не внеклеточным Na^+ . Добавка только Na^+ или только K^+ не влияет на ферментативную активность. Однако, когда присутствуют оба иона, гидролиз АТФ заметно ускоряется. Многочисленные свидетельства указывают на то, что Na^+ - K^+ -АТФаза — ферментный эквивалент системы, ответственной за активный транспорт Na^+ через мембрану (Na^+ -насос).

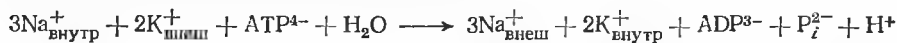
Na^+ - K^+ -АТФаза (молярная масса $\sim 250\,000$) участвует в транспорте Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану клеток всех эукариот. Очищенный фермент состоит из каталитической субъединицы (молярная масса $\sim 95\,000$) и гликопротеидной субъединицы (молярная масса $\sim 50\,000$), молярное соотношение которых, вероятно, равно 2:1.

При гидролизе АТФ большая субъединица фосфорилируется; фосфорилированная форма фермента содержит аспартил-β-фосфатный остаток. Каталитическая субъединица имеет места связывания для Na^+ , K^+ и убаина (сердечного гликозида), ингибирующего активный транспорт Na^+ и K^+ во многих клетках.



Предполагается, что большая субъединица простирается через всю толщу клеточной мембраны, причем места связывания K^+ и убаина оказываются на наружной поверхности мембраны, а Na^+ и АТФ — на внутренней. Сахара гликопротеидной субъединицы представлены сиаловой кислотой, фукозой, N-ацетилглюкозамином и маннозой. Гликопротеид может способствовать правильной ориентации фермента в мембранном бислое, поскольку олигосахариды обычно располагаются на наружной поверхности плазматической мембраны в форме нескольких выступающих образований (разд. 11.2.1). Фосфоглицериды составляют $\sim 1/3$ массы изолированного фермента; такое количество фосфоглицеридов необходимо для активности фермента.

Предложен следующий механизм действия АТФазы. Перенос терминального фосфата АТФ к ферменту происходит в реакции, зависящей от Mg^{2+} и Na^+ , в отсутствие K^+ . При добавлении K^+ к фосфорилированному интермедиату фосфат освобождается в виде P_i . Ниже приведено уравнение реакции, а предполагаемая последовательность показана на рис. 11.9.



Другие явления пассивного транспорта, включающие обязательное участие Ca^{2+} -активируемой АТФазы, рассмотрены позднее (гл. 36 и 37).

Примером активного симпорта служит перенос глюкозы против концентрационного градиента, например из клеток слизистой оболочки кишечника в кровь (гл. 14), и реабсорбция глюкозы из почечного канальца (гл. 35). В этих случаях транспорт глюкозы за-

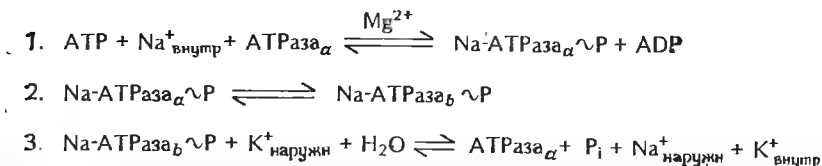


Рис. 11.9. Схематическое изображение транспорта Na^+ и K^+ при участии Na^+ - K^+ -АТРазы. Две формы фермента (*a* и *b*) обозначают возможные конформационные изменения, происходящие во время обмена ионов. Действие уабаина ингибирует K^+ -зависимую реакцию 3, гидролиз фосфорилированной Na^+ -АТРазы. Хотя на рисунке приведено соотношение Na^+/K^+ , равное 1, установлено, что для мембран эритроцитов и аксона кальмара, а также для искусственно приготовленных пузырьков, в которые встраивался очищенный фермент, полученное в опыте соотношение составляло $\text{Na}^+_{\text{внутр}}:\text{K}^+_{\text{наружн}} = 3:2$. Это согласуется с вышеуказанной стехиометрией.

висит от Na^+ — увеличение внеклеточной концентрации $[\text{Na}^+]$ усиливает транспорт глюкозы в клетки. Это сопряжение транспорта Na^+ и транспорта глюкозы позволяет предположить существование белка-переносчика с центрами связывания как для глюкозы, так и для Na^+ . Когда внутри клетки происходит разрядка этих центров, Na^+ -насос возвращает Na^+ обратно во внеклеточную среду. Так как последний процесс нуждается в АТР, то гидролиз АТР, происходящий на одну стадию раньше, опять предоставляет энергию для транспорта глюкозы против ее концентрационного градиента.

Совместный транспорт Na^+ и некоторых аминокислот в клетки обсуждается далее (гл. 21).

Из всего сказанного можно сделать следующие выводы относительно мембранного транспорта:

1. Активный транспорт ионов, включая Na^+ , K^+ и Ca^{2+} , тесно сопряжен с действием мембранной АТРазы, которая, подвергаясь фосфорилированию и дефосфорилированию, продуцирует энергию для транспорта против градиентов концентрации.
2. Аминокислоты и некоторые сахара транспортируются активно, что может сопровождаться метаболическими изменениями транспортируемых молекул. В некоторых животных клетках эти транспортные системы проявляют зависимость от Na^+ .
3. Специфически связывающие белки участвуют в транспортных системах с высоким сродством; индуцированные субстратом конформационные изменения имеют существенное значение в транслोकационной стадии всего процесса переноса через мембрану.

11.3.3. Субклеточные органеллы и внутриклеточные мембраны

Разнообразные химические механизмы, которые лежат в основе клеточных функций, не рассеяны беспорядочно в ядре и цито-

плазме (цитозоле) клеток, а специфически локализованы, как это показано на рис. 11.4. Рисунок также свидетельствует о том, что внутриклеточная организация может проявляться в нескольких формах: в виде субклеточных органелл (с очерченными мембраной границами), нитевидных структур (филаментов), каналов или трубочек (вдоль которых могут двигаться метаболиты), а также в виде маленьких, но дискретных телец или частиц. Более того, несмотря на то что вода составляет $\sim 70\text{--}80\%$ массы основных структурных компонентов организма млекопитающего, многие молекулы, участвующие в клеточных процессах, тесно связаны с другими компонентами клетки, в том числе с липидами, что может оказывать заметное влияние на скорости процессов в клетке. Благодаря такой внутриклеточной организации структурных и химических единиц создается возможность для сопряжения между собой повторяющихся последовательностей и циклов реакций, вследствие чего может достигаться усиление клеточных функций и их последовательное включение (гл. 15), несмотря на участие ограниченного числа реагирующих веществ. Это было бы невозможно при беспорядочном распределении в клетке не связанных друг с другом веществ и катализаторов, участвующих в реакциях.

11.3.3.1. Ядро

Самая крупная структура клетки — *ядро*, видимое под световым микроскопом без специального окрашивания, так как его плотность и светопреломление отличаются от окружающей цитоплазмы. Внутри ядра находятся гранулы хроматина, плотные скопления ДНК-протеида и в меньших количествах РНК-протеида. Ядро обычно содержит обособленное тело — *ядрышко*, богатое РНК. С помощью электронной микроскопии в ядре обнаружены две мембраны. Внутреннюю можно рассматривать как настоящую ядерную мембрану; межмембранное пространство представляет собой продолжение каналов эндоплазматической сети.

11.3.3.2. Митохондрии

Цитоплазма содержит органеллы и частицы различного размера. Самыми большими и плотными из них являются *митохондрии*, которые под электронным микроскопом выглядят как мельчайшие сферы, палочки или нити, окруженные двойной мембраной. В митохондриях сконцентрирован ряд составляющих единое целое ферментных систем, например системы окисления и дыхания (гл. 12). Структура и функция митохондрий рассмотрены в следующей главе.

11.3.3.3. Эндоплазматическая сеть

Многие типы клеток имеют систему ограниченных мембраной каналов — эндоплазматическую сеть, которая может простирается от ядерной мембраны по всей цитоплазме. Мембраны, которые состоят в основном из липопротеидов, отделяют внутренний отсек (цистерну) от внешнего отсека (цитозоля). Конфигурация эндоплазматической сети очень неустойчива, в основном она трубчатая или везикулярная. Различают два связанных между собой типа эндоплазматической сети в зависимости от количества прикрепленных к ее мембранам частиц рибонуклеопротеида — рибосом (гл. 26). На поверхности гладкой эндоплазматической сети нет рибосом, поверхность шероховатой эндоплазматической сети усеяна ими. Эндоплазматическая сеть функционирует в ряде важных процессов, например в синтезе стероидов (гл. 18), образовании пероксисом. Эндоплазматическая сеть также выступает как предшественник других мембранных систем. Рибосомы, прикрепленные к эндоплазматической сети, участвуют в синтезе белка (гл. 26). В процессе гомогенизации клетки эндоплазматическая сеть разрушается с образованием пузырьков — *микросом*, которые можно выделить посредством осаждения центрифугированием. Они являются артефактами этого препаративного метода.

11.3.3.4. Аппарат Гольджи

Связь аппарата Гольджи с секреторными процессами обнаружена с помощью электронной микроскопии и авторадиографии в сочетании с методом фракционирования клетки. Эта органелла играет важную роль в секреции белков и полисахаридов. Белки, синтезированные на рибосомах механизмами, которые обсуждаются в гл. 26, затем транспортируются к аппарату Гольджи, где специфические *гликозилтрансферазы* катализируют перенос углеводных остатков к полипептидным цепям с последующим образованием гликопротеинов. Наряду с этим специфические участки полипептидных цепей могут быть отделены от более крупных молекул белков-предшественников для образования активных секреторных продуктов, таких, как гормоны (гл. 41).

11.3.3.5. Лизосомы

Лизосомы представляют собой цитоплазматические тельца диаметром от 0,5 до 2—3 мкм, окруженные одной мембраной и присутствующие, за редким исключением (эритроциты млекопитающих), во всех животных клетках. Лизосомы содержат различные кислые гидролазы. Одна из них, *кислая фосфатаза*, удобный маркер при идентификации лизосом гистохимическими и цитохимическими методами и при определениях активности ферментов.

Приблизительно три дюжины гидролаз обнаружено в лизосомах, включая *протеазы*, *нуклеазы*, *гликозидазы*, *арилсульфатазы*,

липазы, фосфолипазы и фосфатазы. Способность лизосомных ферментов совместно гидролизовать все классы макромолекул послужила основанием для вывода о том, что эти органеллы представляют собой место внутриклеточного переваривания, которое сопровождается пиноцитоз и фагоцитоз. Лизосомы макрофагов играют решающую роль в защитных механизмах млекопитающих. Фагоцитоз захваченных бактерий приводит к быстрому разрушению этих организмов лизосомными гидролазами. Лизосомы также участвуют в посмертном автолизе, наступающем вслед за разрушением лизосомной мембраны и освобождением ферментов.

11.3.3.6. Пероксисомы

Пероксисомы — обособленная группа часто встречающихся в клетках животных и растений органелл, содержащих ферменты, многие из которых участвуют в метаболизме H_2O_2 . *Уратоксидаза, оксидаза D-аминокислот и оксидаза α -оксикислот* печени образуют H_2O_2 , в то время как *каталаза*, составляющая ~40% общего количества пероксисомного белка в печени крысы, разрушает H_2O_2 .

11.3.3.7. Микротрубочки

Микротрубочки — элементы цитоплазмы, участвующие в создании морфологии клетки, в движении цитоплазмы, во внутриклеточном транспорте и в явлениях сократимости цитоплазмы. Установлена роль микротрубочек в поддержании формы клетки или в осуществлении контроля над ней (цитоскелетная функция), в процессах внутриклеточного движения, например в расхождении хромосом при участии клеточного веретена; микротрубочки выполняют функцию каналов, проводящих направленные потоки. Функции микротрубочек в нервных аксонах рассмотрены в гл. 37.

Микротрубочки — это тонкие цилиндры, имеющие ~20—30 нм в диаметре и толщину стенок 4,5—7,0 нм. Они построены из глобулярного гликопротеида — *тубулина*, молекула которого состоит из двух субъединиц (мол. масса 50 000—60 000), обозначаемых как α - и β -субъединицы. Молекулы тубулина, уложенные в форме спирали, образуют продольные параллельные протофиламенты, которые составляют стенку цилиндра; диаметр этого цилиндра зависит от числа молекул тубулина. Число протофиламентов в микротрубочке, а следовательно, и число молекул тубулина по стенке цилиндра микротрубочки обычно составляют 13, но у разных организмов могут варьировать от 10 до 14. На рис. 11.10 показано расположение субъединиц тубулина и 13 протофиламентов в микротрубочке.

В уплотненных в результате фиксации образцах соседствующие субъединицы смежных протофиламентов расположены на линии, отклоняющейся на ~10° от перпендикуляра к оси протофиламен-

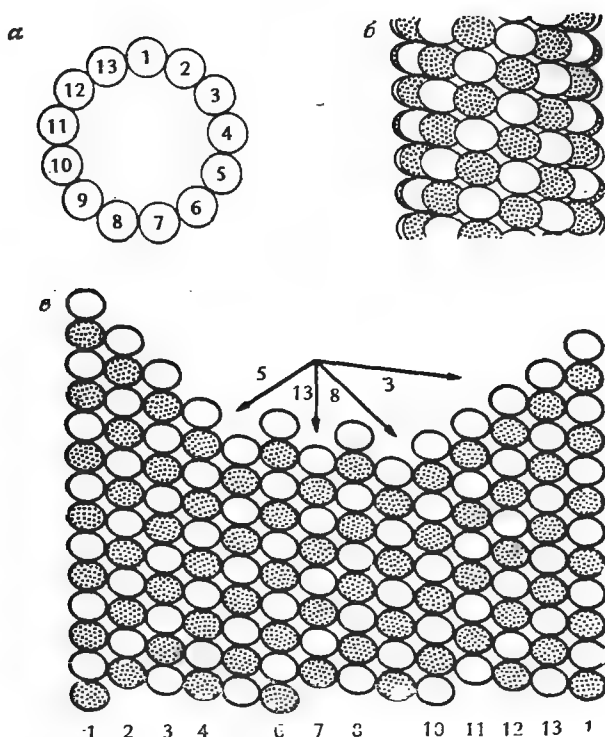


Рис. 11.10. *а* — схематическое изображение поперечного среза цитоплазматических микротрубочек, демонстрирующее расположение 13 протофиламентов. *б* — изображение поверхностной решетки цитоплазматической микротрубочки, показывающее возможное расположение гетеродимеров. Заштрихованные и светлые эллипсоиды — α - и β -субъединицы. Мономеры чередуются вдоль трехзаходовой спирали и внутри протофиламента. *в* — в развернутой трубке показана спиральная сетка. Цифры (прямые) — нумерация протофиламентов. Каждый эллипсоид обозначает мономер, заштрихованные и светлые эллипсоиды соответственно изображают α - и β -субъединицы. Субъединицы чередуются вдоль трехзаходовой спирали, и ось α, β -димера параллельна оси протофиламента. Стрелка 3 показывает угол трехзаходовой спирали, стрелка 13 — угол 13-витковой спирали. α, β -Димеры можно рассматривать как пятивитковую, закрученную вправо спираль (стрелка 5) или как восьмивитковую закрученную влево спираль (стрелка 8). [Snyder J. A., McYntosh J. R., Annu. Rev. Biochem., 45, 706, 1976.]

та. Для образования 13-витковой спирали нужно допустить существование трехзаходовой спирали (рис. 11.10). Если α - и β -субъединицы чередуются внутри протофиламента, то симметрия 13-го порядка трубочек требует, чтобы они чередовались также в направлении трехзаходовой спирали.

Микротрубочки постоянно формируются и разрушаются, что особенно поразительно для тканей мозга. Формирование микротру-

бочек из тубулина представляет собой по существу пример самосборки, так как она инициируется активацией белка посредством GTP, который обнаруживается в изолированном тубулине; GTP связан с каждой из субъединиц. Процесс самосборки затем продолжается путем как латерального, так и продольного взаимодействия и сборки молекул тубулина. Присоединение каждой субъединицы тубулина сопровождается гидролизом GTP (в присутствии Mg^{2+}) с образованием связанного GDP и освобождением P_i . Колхицин — вещество, блокирующее образование микротрубочек, связывается с тубулином, вытесняя нуклеотид, и таким образом предотвращает полимеризацию. Эта функция GTP в полимеризации тубулина, очевидно, аналогична роли АТФ в полимеризации актина (гл.36). Однако сборка тубулина без добавления GTP может происходить в присутствии высоких концентраций глицерина или сахарозы. Ca^{2+} в миллимолярных концентрациях ингибирует полимеризацию микротрубочек. Предполагается, что изменение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} играет регуляторную роль в сборке-разборке микротрубочек. Роль микротрубочек в ограничении латеральной подвижности компонентов плазматической мембраны описана ранее (разд. 11.2.1).

11.3.3.8. Микрофиламенты

Многие типы клеток содержат тонкие цитоплазматические нити (филаменты), состоящие в основном из белка. Подобно микротрубочкам, филаменты участвуют в поддержании стабильности клеточной структуры и в клеточном движении. Последняя функция особенно очевидна для специализированных микрофиламентов. Волочно поперечнополосатой мышцы содержит много длинных миофибрилл, состоящих из правильно расположенных тонких филаментов, участвующих в мышечном сокращении (гл. 36). Микрофиламенты других клеток также содержат белки, очень напоминающие актин мышц. Микрофиламенты участвуют не только в точно ориентированном движении компонентов цитоплазмы, включая и подвижность мембранных компонентов субклеточных оргanelл и плазматической мембраны, но и вносят свой вклад в ранее описанное явление ограничения степени разжиженности плазматической мембраны (разд. 11.2.1) цитоскелетным ансамблем, образуемым микрофиламентами и микротрубочками.

11.4. Экспериментальные подходы к изучению метаболизма

Разработка многих методик преследовала цель выяснить природу химических реакций, происходящих в живых системах, и измерить влияние тех или иных параметров на скорости этих реакций в здоровых и больных организмах.

В экспериментальной науке в отличие от теоретической исследуемую систему помещают в те или иные условия, измеряют некоторый(е) параметр(ы) и устанавливают связь этого(их) параметра(ов) с условиями. Современный уровень понимания метаболизма достигнут с помощью различных экспериментов, включающих такие, при которых животному не наносилось никаких непосредственных повреждений (добавление в пищу животного ничтожного количества помеченного изотопами питательного вещества) и даже принесение животного в жертву (удаление органа, выделение из него фермента и измерение кинетики реакции, катализируемой этим ферментом).

11.4.1. Уровни организации

В интактном организме содержащиеся в нем субстраты и ферменты находятся в определенных пространственных и химических взаимоотношениях. Скорости, с которыми вещества вводятся в данную ткань или выводятся из нее, зависят от активности других тканей и могут соответствующим образом меняться. Многие процессы регулируются продуктами, выделяемыми в кровоток в отдаленных от данной ткани пунктах. Благодаря наличию мембран достигается установление определенных скоростей, с которыми субстраты входят в клетки и внутриклеточные отсеки (компарменты) или покидают их. Поэтому скорость, с которой в нормальной печени выполняются *in situ* различные реакции, может отличаться от скорости, с которой в том же органе, но после изолирования и перфузии (разделения на срезы или измельчения) осуществляются те же самые процессы. Хотя исследование интактного животного представляет много экспериментальных трудностей, существует ряд способов для выяснения природы происходящих в нем процессов. Сюда относятся кормление пищевым рационом, в котором отсутствует то или иное обычное питательное вещество, введение с пищей или парентерально либо аномального материала, либо избытка обычного питательного вещества, введение животному какого-либо метаболита, меченого таким образом, чтобы последующее распределение метки могло быть исследовано. Множество хирургических методов также дает экспериментатору возможность подхода к изучению отдельных тканей или жидкостей тела. Эти методы включают создание фистул различных участков желудочно-кишечного тракта, желчных протоков или лимфатической системы, а также взятие проб крови в различных пунктах кровеносной системы. Исследование влияния частичного или полного удаления того или иного органа также оказывается результативным, хотя при этом нарушения жизнедеятельности организма намного более велики.

Следующий уровень организации, на котором ведутся исследования, представлен перфузируемыми выделенными органами. Исследования на этом уровне могут сопровождаться утратой некоторых регуляторных механизмов, например гормонального и/или нервного контроля, которые действуют на орган при его нормальном расположении в организме. Однако подобные эксперименты оказались результативными для выяснения органа, в котором протекает та или иная реакция, и выяснения природы продуктов, которые могут образовываться после добавления определенного предшественника в перфузионную жидкость.

Еще один уровень организации — это орган, разделенный на срезы. Печень, почки, мозг и другие ткани могут быть разделены на срезы толщиной ~ 50 мкм; омываемая окисью поверхность этих срезов достаточно велика для того, чтобы в течение нескольких часов мог поддерживаться необходимый для жизнедеятельности обмен питательных веществ и продуктов выделения. Часть клеточных мембран надрезается в процессе изготовления срезов, но большинство клеточных компонентов остается внутри клеток. Хотя скорости реакций в клетке среза печени, который инкубируется (при встряхивании) в среде, лишь приблизительно имитирующей внеклеточную, могут отличаться от скоростей в норме, этот метод оказался чрезвычайно полезным из-за относительной простоты

последующих экспериментальных операций. Преимуществом работы на этом уровне организации является возможность установления полного экспериментального контроля не только над органом и предшествующим пищевым режимом животного, но также над составом омывающей жидкости и газовой фазой, которой эта жидкость уравнивается. Добавка возможных предшественников в омывающую жидкость может помочь в подробном выяснении путей метаболизма.

Более низкий уровень организации представляет измельченная ткань. После разрыва клеточных мембран многие взаимосвязи, установленные между частями нормальной клетки, перестают существовать. Работа с измельченной тканью оказалась особенно результативной в исследованиях, направленных на выяснение локализации метаболических процессов внутри клетки, так как при этом становится возможным разделение многообразных структурных элементов клетки, например ядра, мембран, митохондрий и микросом (разд. 11.4.2.2), посредством дифференциального центрифугирования. Добавляя подходящие субстраты, можно установить присутствие или отсутствие той или иной ферментативной активности в этих клеточных фракциях.

Экспериментальная работа на еще более низком уровне организации включает изучение поведения ферментов в растворе. Только на основе изучения очищенного фермента возможно создание полного представления о катализируемой им реакции. Работа с очищенным ферментом позволяет исследовать его кинетические и регуляторные свойства, определить термодинамические параметры реакции и константы равновесия, а также выяснить влияние ингибиторов и активаторов.

Обобщение информации, полученной этими и другими методами, определило современный уровень понимания метаболизма.

11.4.2. Методы, используемые при изучении метаболизма

11.4.2.1. Методы исследования *in vivo*

Определение баланса. Измерение количества какого-либо принимаемого с пищей вещества и количества того же вещества или связанных с ним метаболитов в продуктах выделения давно используется для исследования метаболических процессов *in vivo*. Это позволяет подвести баланс между поступлением и выделением и сделать выводы относительно уровня и природы метаболической активности для того или иного компонента питания.

Лабораторные животные. Сама разрабатываемая проблема может подсказать наиболее целесообразный выбор вида животного для эксперимента. Важные данные для характеристики метаболизма при введении в питание того или иного вещества, имеющие отношение к метаболизму человека, получены в опытах на мышах, крысах, собаках, морских свинках, цыплятах и обезьянах. Исследования для которых необходимо много животных, обычно проводятся на мышах и крысах, которые как экспериментальный материал имеют следующие преимущества: приспособлены для размножения в лабораторных условиях, всеядны, быстро растут и развиваются; к тому же их относительно короткие времена жизни (менее трех лет) позволяют исследовать несколько поколений животных. У этих особей легко проходит инбридинг, что дает возможность получать чистые штаммы и исследовать роль генетических факторов. Исследования роста на крысах предоставили много данных, на которых базируется наука о питании (часть шестая). Однако данные, полученные на одних видах животных, могут отличаться от результатов сходных экспериментов с другими видами. Для получения сведений, наиболее приложимых к пониманию метаболизма человека, проводятся опыты на обезьянах и других приматах.

Естественные и индуцированные нарушения метаболизма. Хирургическое удаление или серьезное повреждение органа *in situ* один из наиболее старых подходов к изучению метаболизма. Например, роль поджелудочной железы в этиологии сахарного диабета открыта в опытах с собакой, у которой удалили поджелудочную железу. Сведения о метаболической роли печени также получены в наблюдениях над собаками с удаленной печенью и над людьми с различными заболеваниями печени.

Некоторые метаболические расстройства названы Гарродом «врожденными ошибками метаболизма», так как они сохраняются в течение всей жизни и передаются по наследству. К врожденным ошибкам, перечисленным Гарродом в 1908 г., относились цистинурия, алкаптонурия, пентозурия и альбинизм. С тех пор у людей обнаружены сотни нарушений метаболизма, имеющих генетическую основу (гл. 27). Обследование людей с такими нарушениями — это еще один экспериментальный подход к проблемам метаболизма, особенно к выяснению его путей. При изучении наследственной природы ошибок метаболизма у микроорганизмов и других видов сделан вывод, что это следствие развития мутантных штаммов. В этом смысле человеческие мутанты напоминают микроорганизмы, у которых существование мутации проявляется в форме неспособности организма осуществлять отдельное метаболическое превращение или группу превращений (гл. 25). Такие бактериальные мутанты оказались очень подходящими для выяснения путей биосинтеза.

Большинство аномалий в метаболизме независимо от того, вызваны ли они несобойной диетой, наркотиками, ядом или болезнью, отражает изменения специфических скоростей одного или нескольких процессов. Эти изменения в скоростях могут в свою очередь привести к изменениям в составе тела, которые, однако, могут быть поняты только при исследовании скоростей процессов. Например, концентрация глюкозы в крови здорового животного относительно постоянна. Однако, как известно, глюкоза быстро утилизируется, и наблюдаемое постоянство ее содержания в крови в действительности является результатом деятельности сложной совокупности механизмов, которые обеспечивают равновесие между скоростями образования и использования глюкозы. В аномальных условиях концентрация глюкозы в крови может подняться; такое повышение — важный признак сахарного диабета. Очевидно, что это повышение концентрации может быть связано с аномальным понижением скорости утилизации глюкозы или с повышением скорости ее образования. Правильное применение изотопных методов (разд. 11.4.2.2) позволяет проанализировать такого рода проблемы с точки зрения индивидуальных скоростей реакций и дает возможность углубленного понимания аномальных ситуаций.

Экспериментальные фистулы. С помощью хирургических методов создают фистулы у экспериментальных животных; это даст возможность отбирать пробы крови или лимфы, поступающих в определенные органы и выходящих из них, а также собирать секреты, выделяемые на различных отрезках желудочно-кишечного тракта или желчных протоков. Использование фистул позволяет изучать реакции, осуществляемые отдельным органом или тканью.

Катетеризация кровеносных сосудов. Степень участия отдельного органа в метаболизме можно оценить путем сравнения химического состава притекающей к нему артериальной крови и оттекающей венозной крови. Метод катетеризации сосудов позволяет также осуществлять отбор проб крови и вводить специфические вещества в артериальный кровоток. Этот способ прижизненного исследования соответствует методу перфузии изолированного органа *in vivo*, описанной ниже, и дополняет метод фистул.

Описанные выше экспериментальные методики включают процедуры, проводимые *in vivo*. Вместе с тем целый ряд исследований метаболизма может производиться *in vitro*. Некоторые из них описаны ниже. Однако данные, полученные в экспериментах *in vitro*, следует интерпретировать с осторожностью. Так извлечение органа или ткани из их естественной среды и использование части

органов (см. ниже) для исследования явлений метаболизма исключает огромное число регуляторных воздействий, которые испытывает *in vivo* каждый орган или ткань. Тем не менее применение разнообразных методов *in vitro* позволило получить важные сведения о метаболических реакциях в живом организме.

11.4.2.2. Методы *in vitro*

Перфузия органа. Используя метод перфузии изолированного органа *in vitro*, можно вводить то или иное вещество и выяснить путь его превращения с помощью анализа выходящей из органа жидкости. Орган помещают в замкнутую систему, в которой циркулирует соответствующая обогащенная кислородом жидкость под повышенным давлением. В состав циркулирующей среды может входить дефибринированная или цельная кровь, содержащая соответствующий антикоагулянт (гл. 29) или эритроциты, суспендированные в растворах физиологически изотонических солевых смесей, которые должны имитировать нормальную плазму по pH, ионной силе и ионному составу. Этот подход используют при исследовании печени, сердца, почек и тонкого кишечника; такие опыты способствуют пониманию роли этих органов в метаболизме. Результативность перфузии органов в изучении метаболизма сильно возросла после разработки методик, в которых изотопно меченный метаболит перфузируется в течение очень короткого периода, и метаболизм резко останавливают быстрым замораживанием ткани («ледяные тиски»); таким образом удается выяснить распределение изотопа среди множества родственных метаболитов в течение нескольких секунд после его введения и через последующие фиксированные интервалы времени.

Метаболизм тканевых срезов, измельченных препаратов и препаратов разрушенных клеток. В 1912 г. Варбург начал исследования метаболизма тканевых срезов с использованием манометрической техники. Количественные изменения объема или давления газа регистрировались в приборе, предложенном ранее Холдейном. Метод Варбурга позволил исследовать метаболизм маленьких фрагментов определенной ткани или органа путем манометрического измерения скорости потребления O_2 и выделения CO_2 (дыхательный коэффициент; см. разд. 11.1.2). С помощью этого метода можно измерить также скорость утилизации какого-либо питательного вещества или субстрата, добавленного в среду, в которую помещена ткань, и определяют природу и количество метаболитов, образующихся в течение эксперимента. Этот метод получил применение при работе со срезами ткани, гомогенатами ткани, препаратами разрушенных клеток или бесклеточными препаратами (см. ниже).

Исследования культуры ткани. Клетки и ткани могут выращиваться только в среде точно установленного состава. Эта способность клеток могла быть использована для исследовательской работы главным образом благодаря выделению и идентификации незаменимых факторов роста, например витаминов и аминокислот, требующихся для размножения клеток. Метод культуры ткани позволяет исследовать биохимические процессы в растущих популяциях животных клеток и в ряде последовательных клеточных генераций. В культуре ткани выращено множество различных типов клеток, как нормальных, так и злокачественных, которые принадлежат нескольким видам млекопитающих, а также человеку. Метод культуры ткани также является подходом к изучению распространения вируса в клетках, позволяя исследовать вирусную репликацию и химические изменения, индуцированные вирусным агентом в клетке хозяина *in vitro*, а также лучше понять сущность опухолевых изменений, вызываемых некоторыми вирусами.

Исследования с использованием микроорганизмов. Микроорганизмы представляют для биохимика возможность работать с простыми живыми формами, удобными для лабораторных исследований. Эти низшие формы имеют сравнительно простые потребности для своего роста и развития, они быстро воспроиз-

водятся и обычно могут выращиваться в больших количествах. Микроорганизмы — хороший источник для получения препаратов отдельных ферментов и препаратов разрушенных клеток для изучения метаболических превращений. Нередко микроорганизмы могут использоваться с целью осуществления химических превращений, которые химику-органику трудно воспроизвести, или с целью получения соединений, которые не столь просто синтезировать в лабораторных условиях. Кроме того, мутантные штаммы микроорганизмов можно легко получить в условиях эксперимента. Большой вклад, который внесли исследования с микроорганизмами в наше понимание биохимической генетики, рассмотрен в гл. 25—28.

Исследования с бесклеточными системами. При разрыве плазматической мембраны освобождаются компоненты клетки. Методом дифференциального

Таблица 11.1

Распределение типичных клеточных компонентов, полученных дифференциальным центрифугированием препарата разрушенных клеток печени

Фракция	Величина центробежного поля для разделения, g	Время центрифугирования, мин	Некоторые ферментативные или другие активности ^a
Обломки клеток; ядра; мембраны	1 000—6 000	10	Синтез нуклеиновых кислот (ядра)
Митохондрии (см. гл. 12)	10 000—15 000	30	Перенос электронов; окислительное фосфорилирование; цикл лимонной кислоты; окисление жирных кислот, окисление аминокислот; синтез мочевины; удлинение цепи жирных кислот
Лизосомы; фрагменты микротрубочек; пероксисомы	15 000—20 000	30	Гидролазы; ферменты, образующие и разрушающие H_2O_2
Микросомы (фрагментированная эндоплазматическая сеть); рибосомы; мембраны эндоплазматической сети; мембраны Гольджи	100 000	60	Синтез белков; гидроксилирующие системы; цитохром b_5 ; гликозилтрансферазы; синтез мукополисахаридов, фосфолипидов, триацилглицеринов и стероидов; редуктазы стероидов; фосфатазы
Растворимая фракция или супернатант (цитозоль)			Гликолитическая система; гексозомонофосфатный путь; синтез гликогена, гликогенолиз; синтез жирных кислот; катаболизм пуринов и пиримидинов; пептидазы; аминоацилсинтетазы; аминокотрансферазы

^a Указанные активности обсуждаются в последующих главах.

центрифугирования (см. ниже) удастся разделить неразрушенные клетки, различные клеточные органеллы и субклеточные частицы, что позволяет исследовать их структуру посредством световой, фазово-контрастной и электронной микроскопии, гистохимическими и цитохимическими методами, а также оценить их метаболический вклад в процессы, совершающиеся в клетке.

Для разрушения клеточных мембран суспензию клеток в соответствующей изотонической среде, например в 0,25 М сахарозе, подвергают воздействию ультразвуковых колебаний или обрабатывают клетки в механическом гомогенизаторе, вращение пестика которого производится вручную или механически; в результате действия на ткань развивающейся при этом силы трения получают препараты разрушенных клеток, не совсем точно называемые *гомогенатами*. Эти препараты содержат мало целых клеток и представляют собой суспензии ядер, митохондрий, микросом, других клеточных органелл и фрагментов плазматических мембран, а также растворимую фазу цитоплазмы — *цитозоль*. При помощи дифференциального центрифугирования суспензии разрушенных клеток при низких температурах разделяют на индивидуальные фракции. В табл. II.1 представлены типичные фракции, полученные этим методом, и дано распределение нескольких важнейших ферментативных систем и реакционных путей в этих фракциях.

11.4.2.3. Применение изотопных индикаторов

Доступность изотопов позволяет метить молекулы для того, чтобы проследить направление метаболических превращений специфических участков их структур. Кроме того, метод изотопных индикаторов очень удобен для маркировки специфических участков или активных центров больших молекул, например ферментов. Введение метки особенно важное значение приобретает при изучении метаболизма обычных компонентов организма, за превращением которых, когда они вводятся, с помощью других способов невозможно следить, поскольку они неотличимы от таких же молекул, уже присутствующих в теле животных. Использование изотопов открывает возможности для таких исследований потому, что химические различия между изотопами любого данного элемента ничтожны, а скорости реакции изотопных соединений доступны для регистрации.

Чаще всего работают с изотопами наиболее распространенных элементов, входящих в состав органических соединений, а именно H, N, C, S, P и O. Кроме того, используются изотопы I, Na, K, Fe и Ca. Помимо стабильных изотопов $H^2(2H)$, $N^{15}(15N)$ и $O^{18}(18O)$ особенно широкое применение получили нестабильные (радиоактивные) изотопы. Количественное измерение радиоактивности технически проще, чем определение стабильного изотопа. Доступность радиоактивных изотопов с относительно большими периодами полураспада делает возможным их использование в длительных экспериментах. Чувствительные методы измерения радиоактивности в сочетании с бумажной и тонкослойной хроматографией и электрофорезом — мощное средство для обнаружения и идентификации соединений в процессе экспериментальной работы.

Биологические приложения метода изотопных индикаторов. Первое соображение, возникающее при применении изотопной методики к решению биологических проблем, касается формы, в которой вводится изотоп. Во многих экспериментах изотопный атом может входить в состав простой молекулы: $^{14}CO_2$, 2H_2O , 3H_2O , $^{24}NaCl$, $NaH_3^{32}PO_4$, $K^{131}I$. В других экспериментах органические соединения, помеченные по одному или нескольким составляющим их атомам, следуют сначала получить путем органического синтеза или биосинтеза. Так, меченый сывороточный альбумин можно приготовить путем включения меченой аминокислоты в рацион животного и последующего выделения альбумина из плазмы животного. Подобным же образом ^{14}C может быть «встроен» в глюкозу при условии проведения фотосинтеза (гл. 16) в атмосфере $^{14}CO_2$ с последующим

гидролизом крахмала, который накапливается в листьях. Нередко требуется включение более чем одной изотопной метки в одно и то же вещество. Такого рода задача возникает, например, при исследовании путей превращения как углеродного скелета, так и атома азота аминокислоты глицина. Для решения этой задачи можно синтезировать ^{14}C -глицин и ^{15}N -глицин отдельно и затем, просто смешав эти два продукта, получить то, что в сущности представляет собой материал с двойной меткой. Соединения с более чем одной изотопной меткой могут также синтезироваться методами, которые приводят к включению более чем одного изотопа в одну молекулу.

Изотопы широко применяются в исследовании *взаимоотношений между предшественником и продуктом*, т. е. для выяснения того, превращается ли соединение А в соединение В в организме. В таких экспериментах вводят меченое соединение А, затем соединение В выделяют, тщательно очищают и проводят определение изотопа. Применение этой методики оказалось особенно полезным для обнаружения в организмах животных реакций, которые ранее были доступны для исследования только в более простой системе. Посредством расщепления вещества и выяснения распределения изотопа среди его атомов можно получить сведения о механизме его превращения.

Метод изотопных индикаторов исключительно важен для измерения скоростей процессов, особенно в случае интактных животных. Количество любого тканевого компонента может быть довольно постоянным у находящегося в состоянии равновесия взрослого животного, но это постоянство в действительности есть результат равновесия между скоростями синтеза и распада этого компонента. До применения изотопных индикаторов не было ни одного удовлетворительного метода для измерения скоростей этих процессов. С помощью изотопных индикаторов проведены исследования двойного рода. В одном варианте пул данного соединения в организме предварительно метится посредством введения меченого материала, и затем следят за постепенным исчезновением изотопа. В другом варианте вводится меченый изотопом предшественник и исследуется появление изотопа в продукте его превращения. Из скоростей изменения концентрации вещества, содержащего изотопную метку, могут высчитаться скорости его синтеза и распада. Такого рода исследования привели к возникновению концепции о непрерывном обновлении (синтез, распад и замена) определенных составляющих организма, что отражает динамическое стационарное состояние даже при постоянном составе.

Метод меченых индикаторов находит применение и при изучении вопроса об *анатомическом распределении* того или иного вещества. В этих экспериментах после введения изотопного материала проводят определение изотопа в различных тканях и полученных из них продуктах, чтобы выяснить, каким образом распределяется между ними атом изотопа. В опытах с радиоактивными изотопами можно использовать дополнительное экспериментальное средство — автордиографию. При этой методике на тканевый срез налагается фотографическая пленка. После соответствующей экспозиции и проявления участки пленки, расположенные близко к радиоактивным областям ткани, должны потемнеть. Применение изотопов с требуемыми в этих опытах радиационными характеристиками позволяет осуществить разрешение на внутриклеточном уровне.

Метод изотопных индикаторов нашел также широкое применение для оценки содержания тех биологических веществ, количество которых в тканях и жидкостях тела очень мало. Состоящая специфические иммунологические методики с методом изотопных индикаторов, можно оценить количество некоторых компонентов крови, например белковых и полипептидных гормонов, а также метаболитов с низкой молекулярной массой. Этот подход, названный *радиоиммунным анализом*, основан на образовании у экспериментального животного, например у кролика, либо антитела в результате инъекции, либо антигенного белка, например полипептидного гормона, либо вещества с низкой молекулярной массой, которое само по себе не обладает антигенными свойствами, но превращается в *гиптен* при ковалентном связывании с определенным белковым переносчиком

(гл. 29). Образующееся антитело, направленное против введенного антигена или гаптена, можно легко пометить (обычно иодом-125). Меченая молекула антитела используется для проведения специфической реакции антитело — антиген в биологической жидкости; с помощью соответствующих методов можно сравнить количество введенной с антителом радиоактивной метки с количеством метки, которое связалось с антигеном в ходе указанной реакции. Во втором варианте анализа меченый антиген используется для того, чтобы вытеснить немеченый антиген или гаптен в биологическую жидкость после обработки последней избыточным количеством немеченого антитела. Количество связавшегося при этом меченого антигена можно легко рассчитать, пользуясь калибровочными кривыми, построенными для чистого антигена (в различных концентрациях относительно соответствующей ему сыворотки).

Эти методики позволяют точно измерять нанограммовые количества веществ и, кроме того, решить такие проблемы, как скорость исчезновения (время полупревращения) введенного вещества, скорость распада вещества в сосудистой системе, локализация введенных веществ в тканях-мишенях, а также степень связывания их со специфическими рецепторами.

Литература

Книги

- Allen J. M.*, ed., *Molecular Organization and Biological Function*, Harper and Row, Publishers, Inc., New York, 1967.
- Berson S. A., Yalow R. S.*, eds., *Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology*, pt. I, General Methodology, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1973.
- Birnie G. D.*, ed., *Subcellular Components: Preparation and Fractionation*, Butterworths, London, 1976.
- Bittar E. E.*, ed., *Membranes and Ion Transport*, vols. 1—3, Academic Press, Inc., New York, 1970, 1971.
- Bourne G. H.*, *Division of Labor in Cells*, 2d ed., Academic Press, Inc., New York, 1970.
- Bresnick E., Schwartz A.*, *Functional Dynamics of the Cell*, Academic Press, Inc., New York, 1968.
- Chase G. D., Rabinowitz J. L.*, *Principles of Radioisotope Methodology*, 2d ed., Burgess Publishing Company, Minneapolis, 1962.
- Christensen H. N.*, *Biological Transport*, 2d ed., Addison-Wesley-W. A. Benjamin, Inc., New York, 1972.
- Cook J. S.*, *Biogenesis and Turnover of Membrane Macromolecules*, Raven Press, New York, 1976.
- DuPraw E. J.*, *Cell and Molecular Biology*, Academic Press, Inc., New York, 1968.
- Ernster L., Estabrook R. W., Slater E. C.*, eds., *Dynamics of Energy-Transducing Membranes*, Elsevier, Amsterdam, 1974.
- Garrod A. E.*, *Inborn Errors of Metabolism*, reprinted with supplement by H. Harris, Oxford University Press, Fair Lawn, N. J., 1963.
- Green D. E.*, ed., *Membrane Structure and Its Biological Importance*, Ann. N. Y. Acad. Sci., 195, 5—519, 1972.
- Greengard P., Robison G. A.*, eds., *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, vols. 1 and 2, Raven Press, New York, 1972.
- Harris E. J.*, *Transport and Accumulation in Biological Systems*, 3d ed., University Park Press, Baltimore, 1972.
- Loewy A. G., Siekevitz P.*, *Cell Structure and Function*, 2d ed., Holt, Rinehart and Winston, Inc., New York, 1969.

- Nicolson G. L., Raftery M. A., Rodbell M., Fox C. F.*, eds., *Cell Surface Receptors*, Alan R. Liss, Inc., New York, 1976.
- Novikoff A. B., Holtzman E.*, *Cell and Organelles*, 2d ed., Holt, Rinehart and Winston, Inc., New York, 1976.
- Ravin B. R., Freedman R. B.*, eds., *Effects of Drugs on Cellular Control Mechanisms*, University Park Press, Baltimore, 1972.
- Revel J. P., Henning U., Fox C. F.*, *Cell Shape and Surface Architecture*, Alan R. Liss, Inc., New York, 1977.
- Soifer D.*, ed., *The Biology of Cytoplasmic Microtubules*, Ann. N. Y. Acad. Sci., **253**, 5—802, 1975.
- Robison G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W.*, *Cyclic AMP*, Academic Press, Inc., New York, 1971.
- Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F.*, *Manometric Techniques and Related Methods for the Study of Tissue Metabolism*, 4th ed., Burgess Publishing Company, Minneapolis, 1964.
- Wallach F. H., Fischer H.*, eds., *The Dynamic Structure of Cell Membranes*, Springer-Verlag, Inc., New York, 1972.

Обзорные статьи

- DeDuve C.*, The Separation and Characterization of Subcellular Particles, *Harvey Lect.*, **59**, 49—87, 1963—1964.
- DePierre J. W., Ernster L.*, Enzyme Topology of Intracellular Membranes, *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 201—262, 1977.
- DePierre J. W., Karnovsky M. L.*, Plasma Membranes of Mammalian Cells: A Review of Methods for Their Isolation and Characterization, *J. Cell. Biol.*, **56**, 275—303, 1973.
- Eagle H.*, Metabolic Studies with Normal and Malignant Cells in Culture, *Harvey Lect.*, **54**, 156—175, 1958—1959.
- Glynn I. M., Karlsh S. J. D.*, The Sodium Pump, *Annu. Rev. Physiol.*, **37**, 13—55, 1975.
- Goldberg N. D., Haddox M. K.*, Cyclic GMP Metabolism and Involvement in Biological Regulation, *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 823—896, 1977.
- Guidotti G.*, Membrane Proteins, *Annu. Rev. Biochem.*, **41**, 731—752, 1972.
- Henderson P. J. F.*, Ion Transport by Energy-conserving Biological Membranes, *Annu. Rev. Microbiol.*, **25**, 393—428, 1971.
- Krebs E. G.*, Proteins Kinases, *Current Top. Cell Regul.*, **5**, 99—133, 1972.
- Masters C. J.*, Metabolic Control and the Microenvironment, *Curr. Top. Cell Regul.*, **12**, 39—74, 1977.
- Nicolson G. L.*, Trans-membrane Control of the Receptors on Normal and Tumor Cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **457**, 57—108, 1976; **458**, 1—72, 1976.
- Oxender D. L.*, Membrane Transport, *Annu. Rev. Biochem.*, **41**, 777—814, 1972.
- Pastan I. H., Johnson G. S., Anderson W. B.*, Role of Cyclic Nucleotides in Growth Control, *Annu. Rev., Biochem.*, **44**, 491—522, 1975.
- Puck T. T.*, Quantitative Growth of Mammalian Cells, *Harvey Lect.*, **55**, 1—12, 1959—1960.
- Rasmussen H., Goodman D. B. P.*, Relationships between Calcium and Cyclic Nucleotides in Cell Activation, *Physiol. Rev.*, **57**, 422—509, 1977.
- Rosen O. M., Rangel-Aldao R., Ehrlichman J.*, Soluble Cyclic AMP-Dependent Protein Kinases: Review of the Enzyme Isolated from Bovine Cardiac Muscle, *Curr. Top. Cell Regul.*, **12**, 39—74, 1977.
- Siakevitz P.*, Biological Membranes: The Dynamics of their Organization, *Annu. Rev. Physiol.*, **34**, 117—140, 1972.
- Singer J. A., McIntosh J. R.*, Biochemistry and Physiology of Microtubules, *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 699—720, 1976.
- Whittam R., Wheeler K. P.*, Transport across Cell Membranes, *Annu. Rev. Physiol.*, **32**, 21—60, 1970.

Глава 12

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ. I

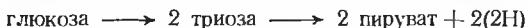
Цикл лимонной кислоты. Митохондрия.

Перенос электронов.

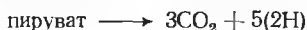
Окислительное фосфорилирование

Энергетические потребности животных клеток, растительных клеток, живущих в отсутствие света, и многих прокариотных микроорганизмов удовлетворяются за счет энергии, освобождающейся при окислении различных органических соединений с участием молекулярного кислорода. В клетках эукариот эти окислительные процессы происходят в митохондриях, получающих из цитоплазмы смесь веществ, которые образовались в ходе предшествующего неполного превращения углеводов, липидов и аминокислот. В митохондриях большая доля свободной энергии, освобождающейся в процессе окисления, запасается в процессе сопряженного синтеза АТФ.

Как было показано ранее, метаболизм глюкозы (см. уравнение, разд. 10.1) включает восстановление шести молекул O_2 на молекулу глюкозы, т. е. от каждой молекулы глюкозы отнимается 12 пар электронов или 12 атомов водорода. В цитозоле каждая молекула глюкозы расщепляется на две идентичные триозы, каждая из которых затем в реакционной последовательности превращается в пируват в результате удаления лишь одной пары атомов водорода:

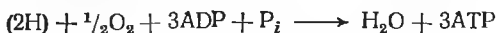


Атомы водорода на соответствующем переносчике, а также пируват поступают затем в митохондрию, где на каждую молекулу пирувата образуются три молекулы CO_2 и пять пар атомов водорода, которые передаются электронным переносчикам:



Каждая из 12 пар электронов, происходящих от начальной молекулы глюкозы, продвигается затем вдоль по организованному ряду электронных переносчиков от переносчика с самым низким потенциалом к переносчику с самым высоким потенциалом и, наконец, к кислороду. В процессе продвижения каждой пары элект-

ронов обеспечиваются возможности для синтеза трех молекул АТФ (по единому механизму):



Таким образом, в целом в ходе этих окислительно-восстановительных процессов образуется 36 молекул АТФ на одну молекулу глюкозы.

В этой главе рассмотрена природа переносчиков электронов, а затем обсуждены превращения пирувата в ацетил-СоА, который является промежуточным продуктом метаболизма углеводов, жирных кислот и некоторых аминокислот; цикл лимонной кислоты, в котором ацетил-СоА окисляется до CO_2 ; структура митохондрий; электронпереносная система, которая проводит электроны от субстрата к кислороду; механизм образования АТФ (окислительное фосфорилирование) и регуляция этих процессов.

12.1. Окислительные ферменты и коферменты

Реакции биологического окисления катализируются ферментами, каждый из которых функционирует, будучи связанным с коферментом или переносчиком электронов. Свойства этих веществ обсуждаются более подробно в следующей главе. Здесь даются лишь общие положения.

Белковый компонент окислительного фермента придает ему субстратную специфичность, активирует как субстрат, так и простетическую группу и часто изменяет окислительно-восстановительный потенциал этой группы. Хотя существует множество окислительных ферментов, известно лишь несколько коферментов; каждый фермент специфичен не только к своему субстрату, но и к своему коферменту. Встречаются реакции, в которых метаболит (MH_2) реагирует непосредственно с O_2 :



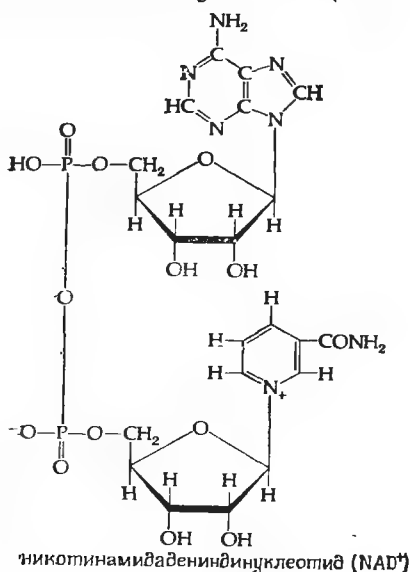
Однако при таких реакциях невозможно запасание энергии для синтеза АТФ. Обычно дегидрогеназа катализирует перенос электрона от субстрата к коферменту:



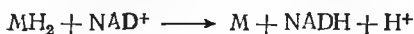
а окисление восстановленного кофермента катализируется другим ферментом в ходе независимого процесса.

12.1.1. Коферменты дегидрогеназ

Как акцептор электронов субстрата чаще всего используется кофермент *никотинамидадениндинуклеотид* (NAD^+)



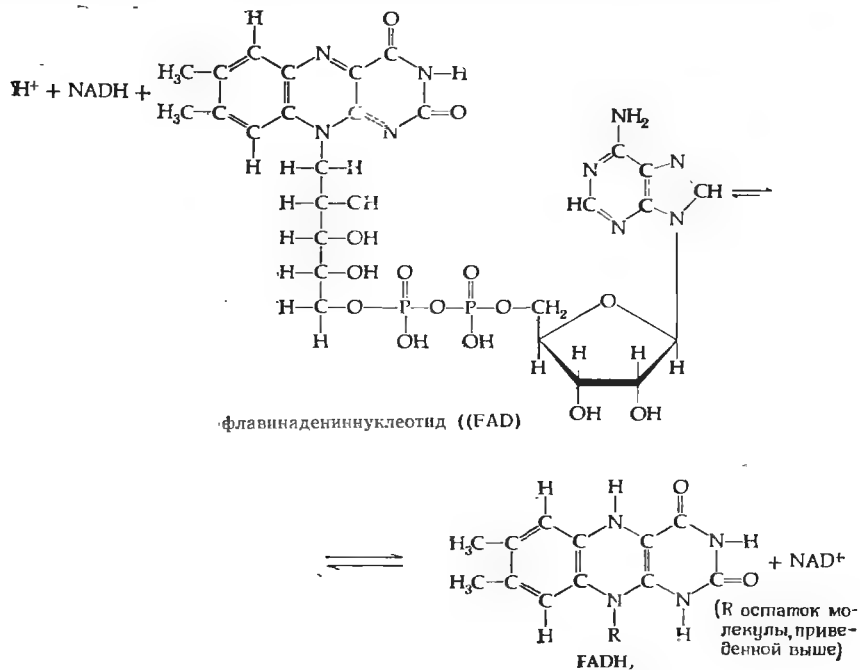
При участии дегидрогеназного белка совершается перенос гидрид-иона от субстрата к никотинамидной части молекулы кофермента, и при этом в среду переходит протон:



Подробности этого процесса описаны в гл. 13. Таким же образом функционирует *никотинамидадениндинуклеотидфосфат* (NADP^+) (разд. 13.1). Восстановленные формы этих коферментов обозначаются соответственно NADH и NADPH . Восстановленный кофермент более уже не взаимодействует с дегидрогеназой. Как окисленный субстрат, так и восстановленный пиридиннуклеотид отделяются от дегидрогеназы; восстановленный кофермент затем вновь окисляется путем переноса электронов к акцептору, связанному со вторым ферментом.

Несмотря на то что NAD и NADP имеют почти одинаковые потенциалы средней точки E_0' , они по-разному используются в метаболизме. В общем случае NAD функционирует в качестве кофермента в большинстве тех реакций, при которых свободная энергия окисления субстрата сохраняется для последующего синтеза АТФ. Так, NAD участвует в пяти из шести стадий процесса окисления глюкозы. С участием NADP как восстановителя протекают процес-

сы синтеза какого-либо клеточного компонента или запасаения энергии. В растениях NADP действует в последовательности реакций, завершающей восстановительный синтез глюкозы из CO_2 с использованием световой энергии. Как у растений, так и у животных NADH используется в последовательности реакций синтеза жирных кислот, стероидов и аминокислот.



Ко второй группе окислительных ферментов относятся ферменты, требующие в качестве кофактора одно из двух производных витамина рибофлавина (гл. 50): *флавиномононуклеотид (FMN)* или *флавинадениндинуклеотид (FAD)*. В противоположность легко отщепляющимся от ферментного белка пиридиннуклеотидам оба флавиновых нуклеотида всегда прочно связаны с белком, в некоторых случаях ковалентно; это соединение называется *флавопротеидом*. Флавопротеиды переносят электроны, как правило, в составе атомов водорода, от органического субстрата к рибофлавиновому компоненту кофермента. С точки зрения значимости катализируемых реакций особенно интересны два флавопротеида; сукцинатоокисляющий (*сукцинатдегидрогеназа*) и катализирующий восстановление своего флавинового кофермента восстановленным пиридиннуклеотидом (*NADH-дегидрогеназа*). Превращения, которые претерпевает восстановленный флавопротеид, рассмотрены далее в этой главе.

12.2. Цикл лимонной кислоты

Главная последовательность реакций, которая обеспечивает электронами систему переноса электронов, где совершается восстановление кислорода с сопряженным образованием АТР, известна под названием *цикла лимонной кислоты, цикла трикарбоновых кислот или цикла Кребса*.

На рис. 12.1 показаны основные промежуточные продукты цикла лимонной кислоты. Последовательность реакций начинается конденсацией ацетил-СоА с щавелевоуксусной кислотой (реакция 1) с образованием шестиуглеродной трикарбоновой (лимонной) кислоты. При каждом обороте цикла потребляется 1 молекула ацетил-СоА и выделяется 2 молекулы CO_2 . Щавелевоуксусная кислота, вступающая в конденсацию, регенерируется, в результате чего обеспечивается непрерывное протекание процесса до тех пор, пока ацетил-СоА продолжает поступать в цикл, а атомы водорода и CO_2 удаляются из него. Из числа индивидуальных реакций цикла четыре относятся к реакциям дегидрирования, причем три из них приводят к образованию NADH. Итоговое уравнение для цикла лимонной кислоты (один оборот) можно записать следующим образом:



Электроны переносятся к O_2 по электронпереносящей цепи, которая рассматривается позднее, а свободная энергия, освобождающаяся в ходе этого процесса, сохраняется в форме АТР. Таким образом, за счет окисления ацетил-СоА в цикле лимонной кислоты клетки получают большую часть всей той потенциальной энергии, которая должна освободиться при окислении глюкозы, жирных кислот и аминокислот. Теперь можно рассмотреть более подробно индивидуальные реакции цикла.

12.2.1. Пируватдегидрогеназа и образование ацетильного производного кофермента А

Молекула кофермента А состоит из аденозин-3'-фосфат-5'-пирофосфата, соединенного сложноэфирной связью с пантотеновой кислотой (витамином), которая в свою очередь соединяется амидной связью с β -меркаптоэтиламином. Рассматриваемая здесь ацетильная группа образует с серой кофермента А тиоэфирную связь. Здесь для кофермента А приняты сокращения СоА или СоА—SH (группа —SH обозначает сульфгидрильную группу кофермента А, а не дополнительную сульфгидрильную группу).

Ацетил-СоА участвует в множестве биологических процессов. Как следует из дальнейшего, ацетил-СоА — предшественник в син-

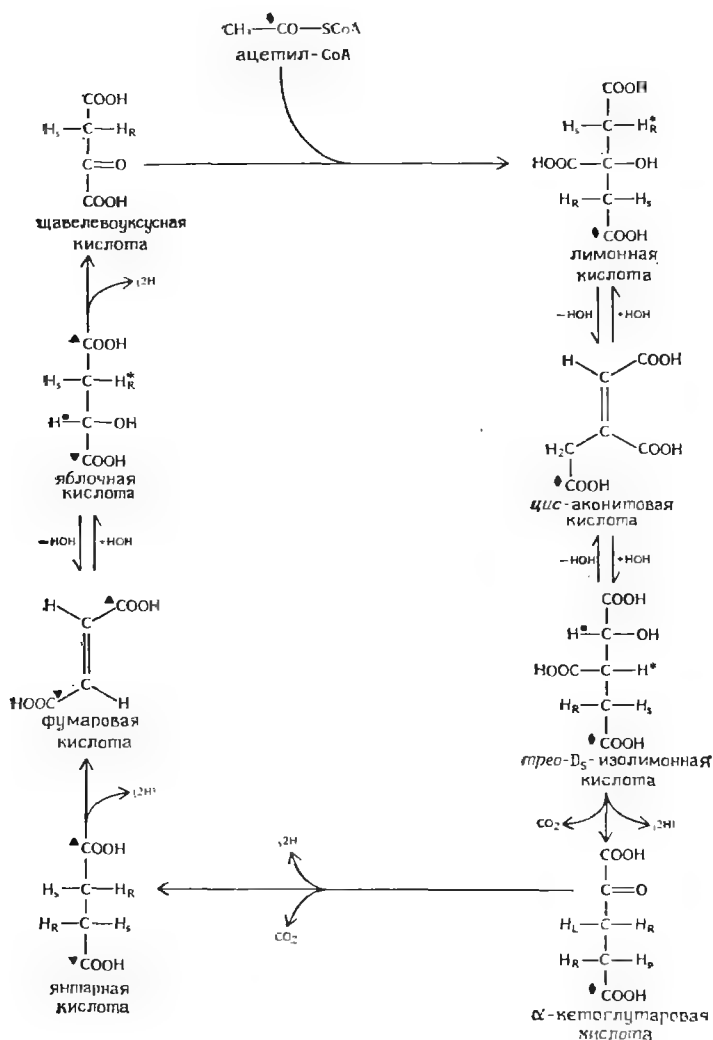
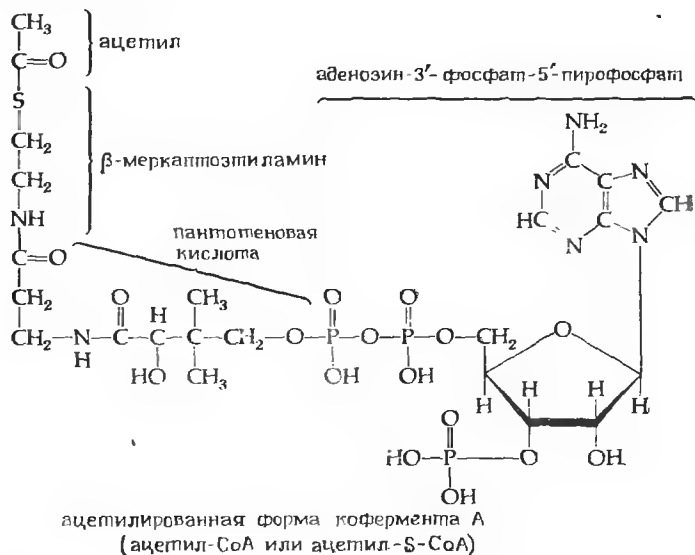
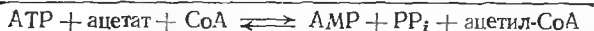
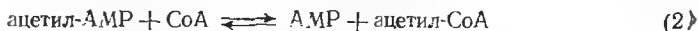


Рис. 12.1. Главные промежуточные продукты цикла лимонной кислоты. Углеродный атом карбоксильной группы ацетил-СоА (отмечен ромбиком) прослеживается в процессе всего цикла. Две карбоксильные группы янтарной кислоты равновесны, и поэтому, если карбоксильный углерод ацетил-СоА вводится в виде ^{14}C , метка распределяется равномерно между обоими карбоксилами четырехуглеродных дикарбоновых кислот (отмечены треугольниками). Атомы водорода, вошедшие в $\text{C}-\text{H}$ -связи при присоединении воды к двойной связи, отмечены звездочкой (*), а водородные атомы, перенесенные к пиридиннуклеотидам, обозначены точкой (•). Каждая из четырех окислительных реакций показана как потеря 2H^+ . Индексы указывают хиральность атомов водорода.

тезе жирных кислот и стероидов из углеводов; он может утилизироваться в синтезе ацетоуксусной кислоты, а также служит ацетилирующим агентом, доступным для других разнообразных синтетических процессов.

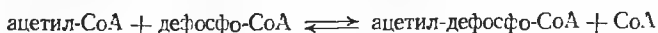


Синтез ацетил-S-CoA непосредственно из ацетата может осуществляться некоторыми организмами, а также происходить в печени и нервной ткани. Для активации ацетата требуется аденозинтрифосфат АТР; продукты реакции — адениловая кислота (АМР) и неорганический пирофосфат (PP_i). Реакция протекает в две стадии, катализируемые одним ферментом — *ацетат-тиокиназой*:



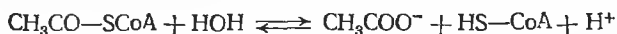
Ацетил-АМР представляет смешанный ангидрид уксусной кислоты и фосфата адениловой кислоты. Ранее (разд. 10.3) приведена общая структура ациладенилатов. Во время реакции свободный ацетил-АМР не появляется, что характерно для всех систем реакций, в которых какой-либо ациладенилат участвует в качестве промежуточного продукта. Ацетиладенилат прочно связан в локусе своего образования на ферменте, и последующая реакция происходит с этим связанным с ферментом промежуточным продуктом. Подобные связанные с ферментом ациладенилаты образуются в качестве промежуточных продуктов при активации жирных кислот

с длинной цепью (гл. 17) и аминокислот (гл. 26). Приведенная последовательность реакций представляется вполне вероятной, поскольку взаимодействие CoA и синтетического ацетил-АМР в качестве субстратов [реакция (2)] катализируется ацетат-тиокиназой, а фермент только в присутствии ацетата катализирует обмен $^{32}\text{P}\text{P}_i$ с АТР, т. е. путем обращения реакции (1). Однако дрожжевая ацетат-тиокиназа также катализирует обратимую реакцию



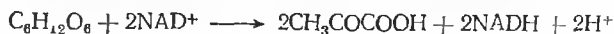
что позволяет предположить участие ацетил-фермента в качестве промежуточного продукта.

Гидролиз ацетил-CoA:



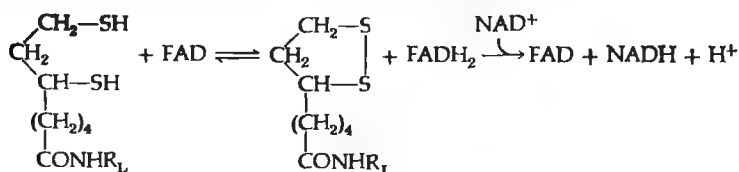
протекает с изменением свободной энергии ΔG° приблизительно на $-10\,000$ кал/моль. Именно эта энергия обуславливает возможность функционирования ацетил-CoA в процессах биологического ацетилирования и представляет собой «движущую силу» синтеза лимонной кислоты. Поскольку совершенно очевидно, что ацетил-CoA — высокоэнергетическое соединение, реакция, катализируемая ацетат-тиокиназой, должна быть легко обратимой. В живой клетке течение реакции в направлении синтеза ацетил-CoA из ацетата обеспечивается фактически необратимым гидролизом неорганического пирофосфата до двух молекул ортофосфата под действием неорганической *пирофосфатазы*, причем ΔG° этой реакции составляет около -7500 кал/моль.

Однако сам ацетат не является обязательным промежуточным продуктом в метаболизме глюкозы. Как указывалось выше, в цитоплазме животных клеток метаболизм глюкозы протекает в последовательности реакций, названной *гликолизом*, где каждая молекула глюкозы превращается в две молекулы пирувата (гл. 14). Этот процесс можно суммарно записать следующим образом:



Пируват представляет собой как бы «точку разветвления» метаболизма. Он может обратно превратиться в глюкозу, восстановиться посредством NADH до лактата или переаминироваться с образованием аланина (гл. 20). Связь между процессом образования пирувата, происходящим в цитоплазме и циклом лимонной кислоты в митохондриях реализуется через синтез ацетил-CoA. Этот процесс происходит в матриксе митохондрии и катализируется прочно связанной мультиферментной единицей, получившей название *пируватдегидрогеназного комплекса*. Комплекс состоит не меньше чем из трех белков, которые используют пять коферментов (тиаминпи-

поевой кислоты в дисульфгидрильной форме. После этого дисульфгидрильная форма вновь окисляется до дисульфидной при участии третьего белкового компонента комплекса, который содержит связанный FAD, и, наконец, восстановленный FAD окисляется присутствующим в среде NAD^+ . На этом весь процесс завершается, и три связанных с ферментами кофермента оказываются в своем исходном состоянии и пригодны для следующего цикла:



Эти реакционные последовательности, в которых участвуют три связанных и два диссоциирующих кофермента, объединены в организованном мультиферментном комплексе, который в животных клетках характеризуется молекулярной массой $\sim 9 \cdot 10^6$. Комплекс состоит из трех отдельных ферментов. Первый из них, *пируватдегидрогеназа*, представляет собой тетрамер из двух β -цепей (мол. масса 36 000), несущих тиаминпирофосфат, и двух α -цепей, необходимых для переноса C_2 -единицы к остатку липоевой кислоты, который связан со следующим ферментным комплексом — *дигидро-*

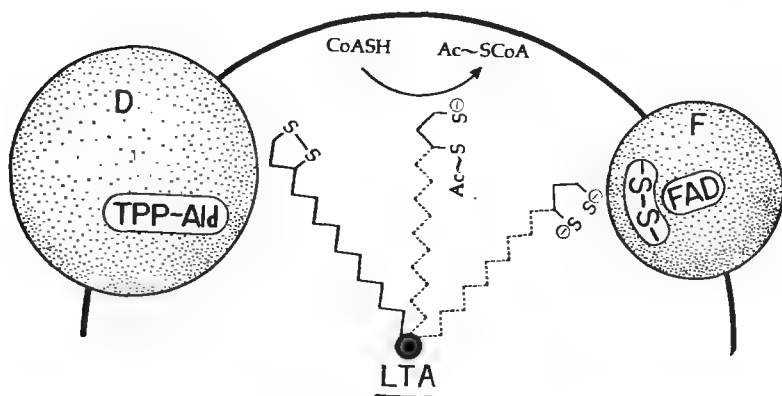


Рис. 12.2. Схематическое изображение предполагаемого вращательного движения липоиллизового остатка между α -оксисульфотиаминпирофосфатом TPP-Ald, связанным с пируватдегидрогеназой D, пунктом переноса ацетила к CoA и реактивной дисульфидной группой флавопротеида, дигидролипоевой кислоты F. Липоиллизовый остаток является интегральной частью дигидролипоеилтрансацилазы LTA. [Любезно предоставлен д-ром Ридом.]

дится с таким ацетил-СоА, наблюдается инверсия относительно метильного углерода (рис. 12.3). На рисунке показаны пространственные положения каждой из замещающих групп относительно исходных карбонильного и метильного углеродных атомов.

12.2.2.2. Лимонная, *цис*-аконитовая и изолимонная кислоты

Процесс обратимых взаимопревращений этих трех кислот, включающий реакции дегидратации и гидратации, катализируется одним ферментом — *аконитазой*. Аконитаза из сердца свиньи (мол. масса 89 000) состоит из двух субъединиц, каждая из которых содержит атом трехвалентного железа. Для того чтобы фермент был максимально активен, его сульфгидрильные группы должны поддерживаться в восстановленном состоянии, для чего требуется дополнительно Fe^{2+} .

Фермент катализирует присоединение воды в *транс*-положение к двойной связи *цис*-аконитата. Как показано на рис. 12.4, образование изоцитрата или цитрата определяется в каждом случае совместным действием имидазольных групп двух гистидиновых остатков. В состоянии равновесия относительное содержание компонентов реакции составляет для цитрата 90%, для *цис*-аконитата 4% и для изоцитрата 6%. Окисление изоцитрата в последующей реакции сдвигает процесс в сторону цикла лимонной кислоты.

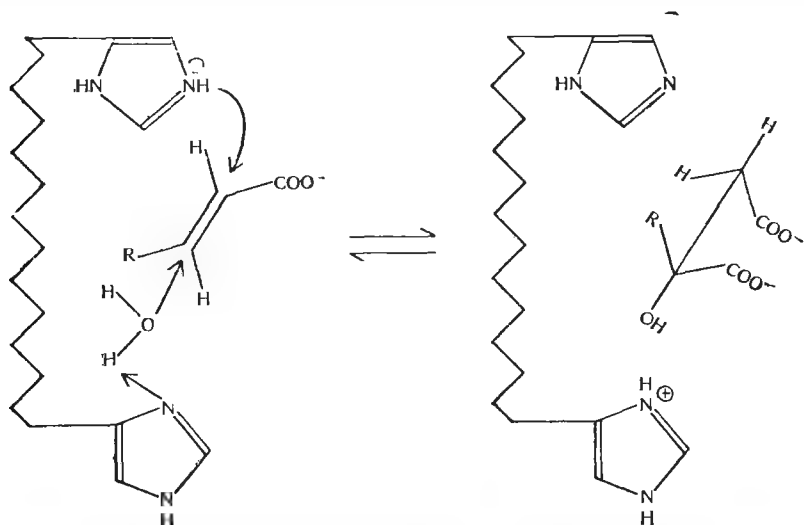
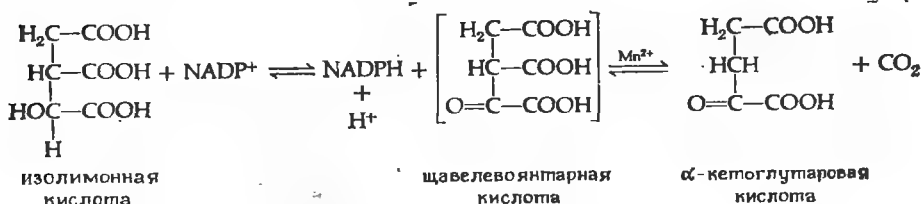


Рис. 12.4. Механизм действия аконитазы. Две имидазольные группы сообща катализируют *транс*-присоединение элементов воды к двойной связи *цис*-аконитата. Показанный здесь продукт представляет собой цитрат. Присоединение воды со стороны другой имидазольной группы приводит к образованию изоцитрата.

Дыхание ингибируется фторуксусной кислотой, в результате чего накапливается лимонная кислота. Фторуксусная кислота превращается во фторацетил-СоА, который затем конденсируется с оксалоацетатом с образованием фторцитрата. Фторцитрат ингибирует аконитазу и таким образом препятствует утилизации цитрата. Только один из четырех возможных изомеров фторцитрата — ингибитор аконитазы. В одном из южноафриканских растений (gifblaar) отравляющее действие объясняется содержащимся в нем фторацетатом.

12.2.2.3. Образование α -кетоглутаровой кислоты

Изолимонная кислота окисляется путем переноса электронов к пиридиннуклеотиду. Животные ткани содержат две *изоцитратдегидрогеназы*, специфичные соответственно к NADP^+ и NAD^+ . NAD -зависимый фермент (мол. масса 330 000), состоящий из восьми идентичных субъединиц, присутствует только в митохондриях. Хотя потребность в двухвалентном катионе лучше всего удовлетворяется за счет Mn^{2+} , хорошо действует и Mg^{2+} в физиологических концентрациях. Каждая молекула фермента имеет четыре центра связывания, каждый — для изоцитрата и NAD . Фермент заметно активируется ADP , который снижает $K_m^{\text{изоцитрат}}$ более чем на 90%. Цитрат — также активатор, хотя и менее эффективный, а NADH представляет собой аллостерический ингибитор. NADP -зависимый фермент, который специфически активируется Mn^{2+} , присутствует как в цитозоле, так и в митохондриях. Его метаболическое значение состоит не в участии в цикле лимонной кислоты, а в том, чтобы поставлять восстановительные эквиваленты для процессов, идущих в цитоплазме. Механизм действия NADP -зависимой изоцитратдегидрогеназы включает промежуточное образование связанного с ферментом оксалосукцината.



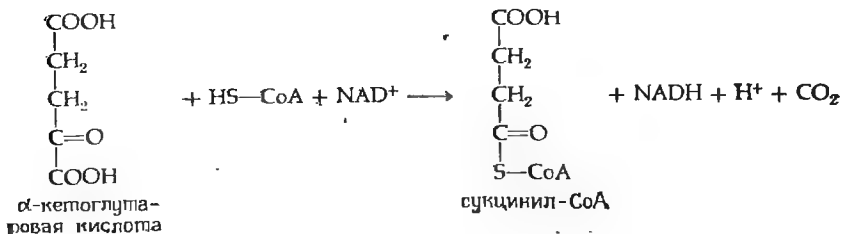
NADP -зависимые изоцитратдегидрогеназы типичны для группы дегидрогеназ β -оксикислот. Ни в одном случае β -кетокислота, образовавшаяся в результате начального дегидрирования, не отделяется от фермента. Вторая стадия, декарбоксилирование, наступает сразу же, но протекает медленно и является лимитирующей скоростью стадий в отсутствие Mn^{2+} . Однако, если свободная β -кетокислота (в данном случае оксалосукцинат) добавляется к фермен-

ту, декарбоксилирование протекает легко, когда присутствует Mn^{2+} . Декарбоксилирование происходит с образованием нестойкого связанного с ферментом хелата Mn^{2+} и β -кетокислоты. При действии малик-фермента (разд. 14.5.1) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы образуются сходные промежуточные продукты (разд. 14.8). Равновесие благоприятствует образованию α -кетоглутарата: в физиологических условиях $\Delta G^\circ \approx -5000$ кал/моль. Хотя не имеется прямых доказательств участия оксалосукцината как промежуточного продукта в процессе, катализируемом NAD-зависимым ферментом, можно допустить, что он находится в связанной с ферментом форме.

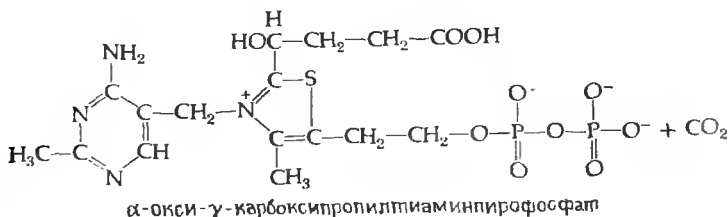
α -Кетоглутарат представляет собой еще один «перекресток» путей метаболизма углеводов, липидов и некоторых аминокислот. Процессы переаминирования или окисления глутаминовой кислоты — важный источник α -кетоглутарата в метаболизме млекопитающих (гл. 21). Более того, все те аминокислоты, которые в процессе своего метаболизма могут превращаться в глутаминовую кислоту, — также потенциальные предшественники α -кетоглутарата. К ним относятся орнитин, пролин, глутамин и гистидин (гл. 23). Напротив, глутаминовая кислота и ее производные образуются из α -глутарата, продуцируемого циклом лимонной кислоты.

12.2.2.4. Превращение α -кетоглутаровой кислоты в янтарную кислоту

Окисление α -кетоглутарата происходит аналогично окислению пирувата (разд. 12.2.1). Процесс с $\Delta G^\circ = -8000$ кал/моль катализируется мультиферментным комплексом (масса частицы $\sim 2,5 \cdot 10^6$). Комплекс состоит из 24 цепей *транссукцинилазы* (мол. масса 42 000), организованных в виде ансамбля, имеющего октаэдрическую симметрию, к которому прикреплены 12 молекул *α -кетоглутаратдегидрогеназы* (мол. масса 95 000) и 12 цепей *дигидролипиддегидрогеназы* (мол. масса 56 000). Дигидролипиддегидрогеназа идентична ферменту, присутствующему в пируватдегидрогеназном комплексе:



В начальной стадии α -кетоглутарат реагирует с тиаминпирофосфатом с образованием α -окси- γ -карбоксипропилтиаминпирофосфата

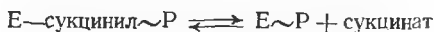


Четырехуглеродная цепь затем переносится к связанной с ферментным белком липоевой кислоте с образованием сукциниллипоилфермента. Сукцинильная группа в свою очередь переносится к коферменту А, а дигидролипоамид вновь окисляется под действием NAD^+ так же, как в процессе окисления пирувата. Сам сукцинил-СоА является мощным конкурентным ингибитором процесса.

Сукцинил-СоА может вступать в реакцию конденсации с глицином и тем самым вводиться в систему синтеза порфирина (гл. 22). Однако, в связи с тем что для осуществления следующей стадии работающего цикла лимонной кислоты требуется свободный сукцинат, из сукцинил-СоА в катализируемой *сукцинат-тиокиназой* реакции удаляется СоА, причем энергия макроэргической связи сохраняется:



GDP и GTP — гуанозинди- и гуанизинтрифосфаты соответственно. Один белок (мол. масса 140 000) катализирует следующие последовательные стадии процесса:



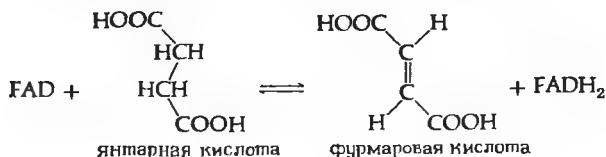
Нуклеозид-дифосфат — киназа, свободно связанная с внутренней митохондриальной мембраной, катализирует перенос фосфата от GTP к ADP. В этом процессе, как и в процессе, катализируемом сукцинат-тиокиназой, N-3 имидазольной группы гистидинового остатка фермента принимает и переносит фосфатную группу:



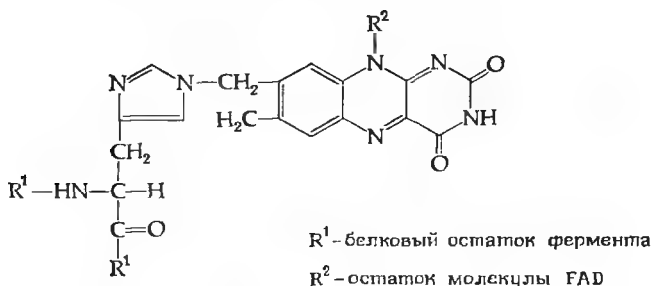
GTP может непосредственно использоваться в различных метаболических процессах, например в активации жирных кислот (гл. 17) и синтезе белка (гл. 26).

12.2.2.5. Дегидрирование сукцината

Окисление сукцината до фумарата, катализируемое *сукцинат-дегидрогеназой*, — единственная реакция дегидрирования в цикле лимонной кислоты, в которой не участвует NAD^+ :



Сукцинатдегидрогеназа, полученная из сердечной мышцы (мол. масса 97 000), представляет собой интегральный белок внутренней мембраны митохондрий. Фермент состоит из двух субъединиц с мол. массой 70 000 и 27 000. Более крупный компонент имеет субстратсвязывающий центр, а также содержит FAD, который ковалентно связан с гистидиновым остатком фермента:



Кроме того, обе субъединицы содержат *негеминное железо*, напоминая в этом отношении некоторые белки электронпередающих систем митохондрий, хлоропластов, пузырьков плазматической мембраны бактерий, мембран эндоплазматической сети, а также относительно небольшую группу растворимых ферментов. В большинстве случаев эта структурная группировка обуславливает характерное поглощение в видимой области спектра, а в восстановленной форме дает отчетливый спектр электронного парамагнитного резонанса ($g=1,94$). При наиболее распространенной структуре $(\text{FeS})_2$ (две группы этого типа входят в состав субъединицы сукцинатдегидрогеназы с мол. массой 70 000) хромофор негеминного железа состоит из пары атомов железа, расположенных друг к другу достаточно близко для того, чтобы делить между собой единственный электрон или вступать в антиферромаг-

нитное сопряжение. Кажущаяся наиболее разумной структура хромофора негеминового железа показана ниже (рис. 13.14).

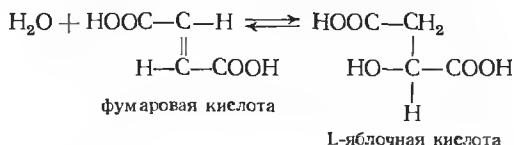
Окислительно-восстановительный потенциал этой группы определяется белком, в котором она находится. E'_0 групп на большой субъединице оцениваются значениями 240 и 30 мВ соответственно. E'_0 пары сукцинат/фумарат составляет около +30 мВ. На малой субъединице находится еще один ансамбль негеминового железа, соответствующий типу, обозначаемому $(\text{FeS})_4$ ($E'_0 \approx 120$ мВ). Электроны движутся от субстрата к флавину и через группы негеминового железа на большой субъединице к негеминному железу на малой субъединице. Хотя можно было бы рассматривать только большую субъединицу как собственно сукцинатдегидрогеназу, эти две субъединицы тесно связаны друг с другом в структуре митохондриальной мембраны.

Продукт реакции находится в *транс*-форме; *цис*-изомер — маленовая кислота не образуется этим ферментом. Малонат — специфический конкурентный ингибитор. В достаточно высоких концентрациях малонат может применяться для прерывания цикла лимонной кислоты; в результате происходит накопление сукцината.

Оксалоацетат, конечный продукт цикла, в низких концентрациях — мощный ингибитор сукцинатдегидрогеназы. Ингибированный фермент со связанным с ним оксалоацетатом становится неактивным, т. е. каталитически инертным, если только оксалоацетат не диссоциирует. Перейдя в неактивную форму (природа молекулярного изменения неизвестна), фермент вновь приобретает активность только при действии специфических активаторов, особенно АТР и восстановленной формы убихинона (разд. 12.4.1), который в митохондриях играет роль непосредственного акцептора электронов от сукцинатдегидрогеназного комплекса.

12.2.2.6. Образование малата

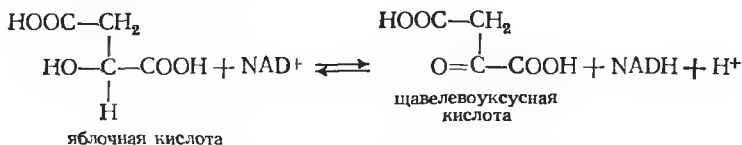
Обратимая гидратация фумарата с образованием L-малата катализируется *фумаразой* — тетрамером из четырех идентичных полипептидных цепей (мол. масса каждой 48 500):



Для реакции в том виде, как она записана, $K=4$, и, следовательно, она легко обратима. Примечательна абсолютная стерическая специфичность в отношении *транс*-присоединения H и OH по двойной связи фумарата и к образованию только L-оксикислоты.

12.2.2.7. Регенерация оксалоацетата

Малат окисляется в присутствии малатдегидрогеназы и с образованием оксалоацетата:

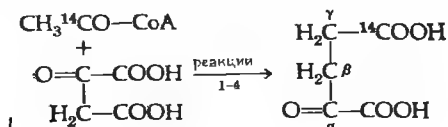


Фермент (мол. масса 66 000) состоит из двух субъединиц, для которых известны две формы, так что в митохондриях печени крысы были обнаружены три изофермента. В центре связывания NAD^+ присутствует сульфгидрильная группа. Этой реакцией цикл полностью завершается, и образующийся оксалоацетат становится доступным для конденсации со следующей молекулой ацетил- CoA для повторения процесса. Однако в состоянии равновесия направление процесса сдвинуто в сторону обратной реакции — восстановления оксалоацетата под действием NADH . Хотя это обстоятельство позволяет избежать накопления мощного ингибитора сукцинатдегидрогеназы, оно также и лимитирует возможную скорость синтеза цитрата. В самом деле, равновесная концентрация оксалоацетата в этой реакции намного меньше K_m цитрат-синтазы. Поэтому предполагается, что малатдегидрогеназа и цитрат-синтаза могут быть физически очень сближены внутри митохондриального матрикса для того, чтобы в нужном количестве обеспечивалось необходимое для синтеза цитрата поступление субстрата — оксалоацетата.

12.2.3. Цикл лимонной кислоты: стереические аспекты

12.2.3.1. Биологическая асимметрия лимонной кислоты

Лимонная кислота не имеет асимметрично замещенного атома углерода и поэтому не обладает оптической активностью. Это обстоятельство дало повод ожидать, учитывая реакции, изображенные на рис. 12.1, что введение $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетил- CoA в метаболический путь приведет к образованию α -кетоглутарата, в равной степени меченного по обеим карбоксильным группам. Однако в действительности продукт, получавшийся в этих экспериментах, оказался меченным исключительно по углероду γ -карбоксила:



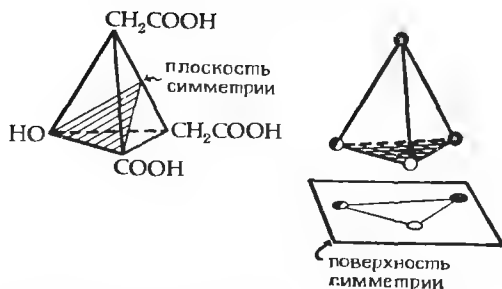


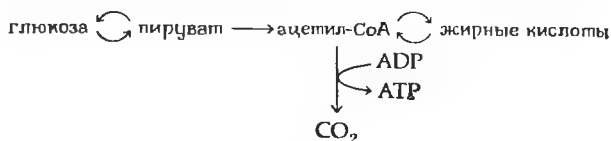
Рис. 12.5. Асимметрия, выявляемая при присоединении лимонной кислоты к поверхности фермента в трех точках. Центральный атом углерода лимонной кислоты находится в центре равностороннего четырехгранника. Наличие плоскости симметрии делает молекулу в растворе фермента оптически неактивной. Если поверхность фермента асимметрична и присоединение молекулы лимонной кислоты может осуществиться только за счет $-\text{OH}$ -, $-\text{COOH}$ - и $-\text{CH}_2\text{COOH}$ -групп так, как это показано, тогда лишь одна плоскость четырехгранника (заштрихованная крест-накрест) может разместиться на поверхности фермента. Следовательно, две группы $-\text{CH}_2\text{COOH}$ не равноценны и лишь одна из них прикрепляется к поверхности фермента.

Именно это наблюдение привело к признанию того, что, как это показано на рис. 12.4 и 12.5, две $-\text{CH}_2\text{COOH}$ -группы лимонной кислоты геометрически истинно неравноценны и что эта неравноценность становится очевидной при присоединении молекулы лимонной кислоты к поверхности фермента в трех точках. Хиральность атома углерода, который не является оптически активным в обычном смысле, отмечалась ранее при синтезе цитрата.

Каждая стадия цикла лимонной кислоты полностью стереоспецифична (рис. 12.1). Как уже говорилось, аконитаза легко различает две $-\text{CH}_2\text{COOH}$ -группы лимонной кислоты, так что последовательное отнятие и присоединение воды специфически приводят к *трео*-D₅-изоцитрату. Возможность проследить судьбу каждого атома водорода во всей последовательности реакций иллюстрируется схемой, приведенной на рис. 12.1. В то время как на 1 моль потребленного ацетил-СоА образуется 2 моля CO_2 , ни один из атомов углерода, выделенных в виде CO_2 , не происходит из этого ацетил-СоА на первом обороте цикла. На уровне свободного сукцината происходит рандомизация, и изотоп, введенный в форме ^{14}C -карбоксильного углерода остатка ацетата в ацетил-СоА, симметрично распределяется относительно плоскости симметрии. На последующих оборотах цикла по мере образования и утилизации оксалоацетата углерод ацетила выделяется в виде CO_2 .

12.2.4. Регуляция цикла лимонной кислоты

Основные процессы, которые поставляют и запасают энергию в клетках, могут быть в общей форме изображены следующим образом:



Регуляция этой системы *inter alia* должна гарантировать постоянное поступление АТФ соразмерно с существующими в данный момент энергетическими потребностями, обеспечивать превращение избытка углеводов в жирные кислоты через пируват и ацетил-СоА и наряду с этим контролировать экономное расходование жирных кислот через ацетил-СоА как ключевой продукт для входа в цикл лимонной кислоты с тем, чтобы ограничить потребление пирувата в случае дефицита углеводов.

Цикл лимонной кислоты предоставляет электроны в электронпереносящую систему, в которой поток электронов сопряжен с синтезом АТФ, и в меньшей степени снабжает восстановительными эквивалентами системы биосинтеза промежуточных продуктов, которые вливаются также в другие метаболические пути. В принципе цикл не может протекать быстрее, чем это позволяет использование образуемой АТФ. В предельном случае при обязательном сопряжении потока электронов и синтеза АТФ, если бы весь АДФ клетки превратился в АТФ, не могло бы быть никакого дальнейшего потока электронов от NADH, который накапливается, к O₂. Ввиду отсутствия NAD⁺, необходимого участника процессов дегидрирования цикла, последний перестал бы функционировать. В дополнение к этой грубой взаимосвязи существуют более тонкие регуляторные приспособления, которые модулируют действие ферментов в самом цикле лимонной кислоты.

Сукцинатдегидрогеназа находится во внутренней митохондриальной мембране. Все остальные ферменты цикла лимонной кислоты растворены в матриксе, заполняющем внутреннее пространство митохондрии. Измерения относительных количеств этих ферментов и концентраций их субстратов (в стационарном состоянии) в митохондриях, снабженных АДФ и P_i, указывают на то, что индивидуальные стадии процесса «пригнаны» друг к другу; каждая из реакций протекает с одинаковой скоростью, как им, конечно, и полагается. Как только пируват (или другой потенциальный источник ацетил-СоА) поступает внутрь матрикса митохондрии, весь цикл протекает внутри этого отсека. Относительно немногие субстраты

могут пересекать внутреннюю мембрану митохондрии благодаря простой диффузии. Липидный бислой и связанные с ним белки представляют собой эффективный барьер для большинства органических соединений и для ионов. Вход внутрь матрикса митохондрии или выход из него совершается либо посредством *облегченного обмена* на специфическом белке, который служит в качестве носителя (разд. 11.3.2), либо посредством активного транспорта (разд. 11.3.2). Пока еще нет достаточно подробного представления о том, каким образом группа переносчиков во внутренней мембране сообща поддерживает на соответствующих уровнях концентрации различных субстратов цикла лимонной кислоты в митохондриальном матриксе. Но очевидно, что эти устройства эффективны и, например, не допускают избыточного внутримитохондриального накопления пирувата или цитрата, когда эти вещества не окисляются, или не препятствуют входу малата извне, если он требуется для поддержания работы цикла.

На рис. 12.6 показаны основные механизмы регуляторного контроля цикла. В некоторых участках стимуляция или ингибирование определяется относительными концентрациями $[NADH]/[NAD^+]$, $[ATP]/[ADP]$ или $[AMP]$, $[ацетил-CoA]/[CoA]$ или $[сукцинил-CoA]/[CoA]$. Когда эти отношения высоки, клетка достаточно обеспечена энергией и поток через цикл замедлен; когда же они низки, клетка испытывает потребность в энергии, и поток через цикл ускоряется.

Как *необратимая* реакция, соединяющая метаболизм углеводов с циклом лимонной кислоты, пируватдегидрогеназная реакция должна хорошо контролироваться. Это достигается двумя способами. Во-первых, фермент, который активируется несколькими интермеднатами гликолиза, конкурентно ингибируется своими собственными продуктами — $NADH$ и ацетил- CoA . При прочих равных условиях увеличение отношения $[NADH]/[NAD^+]$ от 1 до 3 вызывает 90%-ное снижение скорости реакции, а увеличение отношения $[ацетил-CoA]/[CoA]$ приводит к количественно подобному эффекту. Эффект проявляется мгновенно. Медленнее возникают, но дольше действуют эффекты другого регуляторного устройства. С сердцевиной каждой «молекулы» дигидролипоилтрансацилазы связано около пяти молекул *киназы пируватдегидрогеназы*, которая за счет ATP катализирует фосфорилирование серинового остатка в α -цепи пируватдегидрогеназного компонента. Будучи фосфорилирован, фермент не способен декарбоксилировать пируват. K_m для связывания тиаминпирофосфата возрастает в несколько раз, начиная от 50 нмоль/л, и добавленный оксиэтилтиаминпирофосфат не может отдать свой C_2 -фрагмент остатку липоевой кислоты. Киназа, как и сама дегидрогеназа, чувствительна и к $[NADH]/[NAD^+]$, и к $[ацетил-CoA]/[CoA]$, но в этом случае $NADH$ и ацетил- CoA выступают как стимуляторы киназы; то же относится и к ATP . Вместе

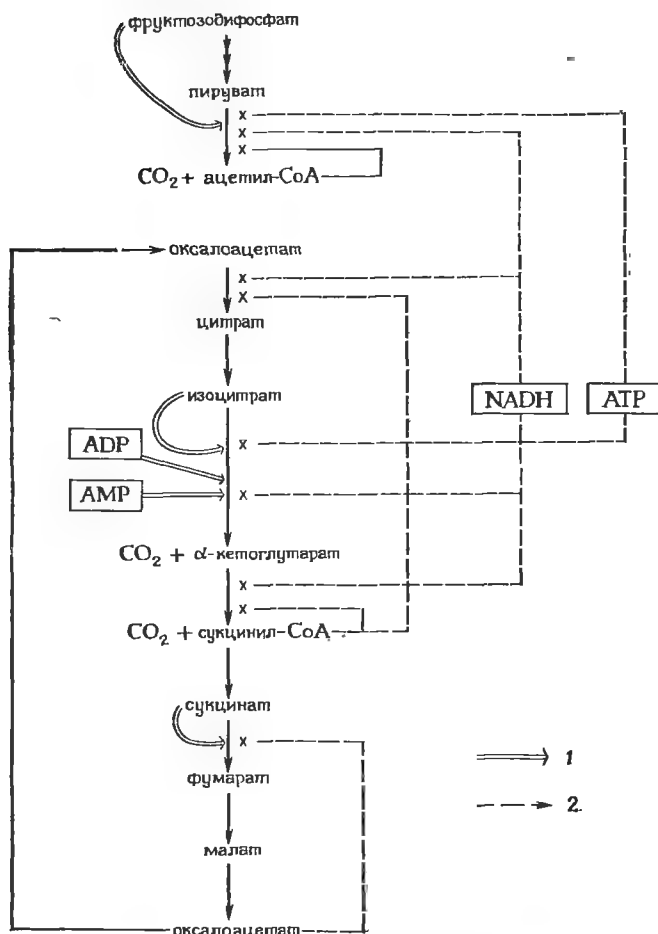


Рис. 12.6. Некоторые аспекты саморегуляции цикла лимонной кислоты; 1 — стимуляция; 2 — ингибирование.

с тем с трансацетилазой связано несколько молекул Ca^{2+} - Mg^{2+} -зависимой *фосфатазы*, действие которой восстанавливает активность пируватдегидрогеназы.

Когда происходит окисление жирных кислот, пируватдегидрогеназа заметно ингибируется. По-видимому, это явление объясняется сопутствующими процессу окисления высокими концентрациями АТР, ацетил-СоА и NADH. Большинство тканей содержит избыток пируватдегидрогеназы, так что после приема корма в печени, а также в мышце и в жировой ткани у животных в состоянии покоя лишь 40, 15 и 10% пируватдегидрогеназы соответственно на-

ходится в активной, нефосфорилированной форме. Когда возрастает потребность в АТР, концентрации NAD^+ , CoA и ADP возрастают за счет использования NADH , ацетил- CoA и АТР, а киназа инактивируется. Однако фосфатаза продолжает функционировать, вновь активируя дегидрогеназу. Повышение $[\text{Ca}^{2+}]$ может активировать митохондриальную фосфатазу, уменьшая даже в 20 раз эффективную K_m по фосфорилированному ферменту, выступающему в качестве субстрата для фосфатазы.

Синтез цитрата — стадия, лимитирующая скорость цикла лимонной кислоты. До некоторой степени регуляция на этой стадии совершается благодаря небольшому, но достаточно значимому ингибированию цитрат-синтазы посредством NADH и сукцинил- CoA , одновременное связывание которых с ферментом вызывает повышение K_m ацетил- CoA . Но основное влияние на скорость синтеза цитрата оказывает поступление субстрата. Если запас АТР пополняется, то связанное с этим увеличение $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ автоматически вызывает повышение отношения [малат]/[оксалоацетат], сильно уменьшая подачу того субстрата, который в любом случае должен возвращаться из более ранних стадий цикла, так как цикл «протекает», только если NAD^+ и ADP легко доступны.

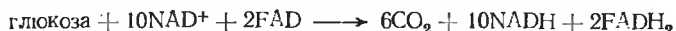
Активность изоцитратдегидрогеназы регулируется в зависимости от концентраций Mg^{2+} , изоцитрата, NAD^+ , NADH и AMP . Кроме субстратсвязывающих центров для NAD^+ , изоцитрата и Mg^{2+} фермент имеет еще и положительные, и отрицательные эффекторные участки. Изоцитрат — положительный эффектор; его связывание кооперативно, т. е. связывание на каком-либо одном участке облегчает связывание на других. Оба участка связывания для AMP стимулируют активность фермента. Когда они заполнены, связывание изоцитрата облегчается. В направлении уменьшения активности работают четыре участка, которые могут заполняться или NADH , или АТР, повышая таким образом K_m для изоцитрата на субстратных центрах.

Таким образом, ферментативная активность определяется отношениями $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ и $[\text{AMP}]/[\text{АТР}]$.

AMP — положительный эффектор комплекса α -кетоглутаратдегидрогеназы, который в этом отношении напоминает изоцитратдегидрогеназу. Связывание AMP уменьшает K_m для α -кетоглутарата в 10 раз. В области физиологических концентраций и сукцинил- CoA , и NADH обладают ингибирующим действием, причем концентрация сукцинил- CoA , по-видимому, главный фактор, управляющий скоростью процесса. Сукцинатдегидрогеназа напоминает изоцитратдегидрогеназу в том отношении, что субстрат (сукцинат) выполняет функцию положительного аллостерического эффектора. Оксалоацетат — мощный ингибитор, однако неясно, действует ли этот контроль в нормальных условиях.

12.3. Структура митохондрии

Превращения глюкозы в результате завершения цикла лимонной кислоты можно представить следующим образом:



[АТР, получающаяся при гликолизе (разд. 14.4.3) и при превращениях сукцинил-СоА, образующегося в цикле лимонной кислоты (разд. 12.2.2), в этом уравнении не принимается во внимание.] Реакции цикла лимонной кислоты катализируются ферментами, из которых все, кроме сукцинатдегидрогеназы, растворены в жидкости митохондриального матрикса. Напротив, реакции, при которых NADH и FADH₂ окисляются и большая часть сопряженно выделяющейся свободной энергии сохраняется в результате синтеза АТР, катализируются ферментами, которые либо являются частью митохондриальной внутренней мембраны, либо прочно прикреплены к ней. Поэтому ниже в общих чертах рассмотрена эта структура.

Митохондрии, обнаруженные во всех клетках животных и растений, как правило, представляют собой тельца продолговатой формы размером 0,5×3 мкм. В живой клетке форма отдельных митохондрий может варьировать от нитей до палочек, петель и сфер. В некоторых тканях митохондрии выстраиваются в клетках таким образом, чтобы облегчить доставку АТР к использующим энергию структурам. Так, например, они располагаются в ряд вдоль сократительных волокон мышечных клеток, сосредоточиваются в соответствии с направлением движения секрета в ацинарных клетках поджелудочной железы или обволакивают своеобразной оболочкой (от середины до основания) структуры хвостов сперматозоидов. Число митохондрий варьирует в зависимости от размера и энергетических потребностей клетки. Так, в одной клетке спермы может содержаться 250, в клетке печени — от 500 до 2000, а в клетке гигантской амёбы *Chaos chaos* — 500 000 митохондрий.

Серийные исследования тщательно выполненных срезов отдельных клеток показывают, что дрожжевые митохондрии имеют большую величину по сравнению с той, которую предполагали ранее. Выраженная неправильность и аморфность их формы приводят к тому, что очень тонкий срез одной митохондрии можно принять за несколько более мелких митохондрий. Во всяком случае, митохондрии — это те основные компоненты животных и растительных клеток, которые участвуют в окислительном метаболизме; ~20% всего белка клеток печени заключено в митохондриях.

Кроме ферментов цикла лимонной кислоты митохондрии содержат системы, переносящие электроны от интермедиатов цикла лимонной кислоты к кислороду; в них также реализуются меха-

низмы, благодаря которым энергия этого процесса сохраняется в результате образования АТФ. Эти органеллы также содержат ферменты окисления жирных кислот (гл. 17), ферменты метаболизма фосфоглицеридов и других структурных липидов (гл. 18), различные ферменты метаболизма азота, такие, как *глутаматдегидрогеназа* и несколько аминотрансфераз, и некоторые ферменты, необходимые для синтеза мочевины (гл. 21). На самом деле, митохондрия сердца быка может содержать набор из 100 различных белков.

Все митохондрии состоят из двух отдельных мембранных мешков. Мембрана внутреннего мешка отдалена на 50—100 Å от мембраны наружного, которая образует границу между клеточным соком и содержимым митохондрии. Наружная мембрана примерно на 50% состоит из липида и на 50% — из белка. Внутренняя мембрана — это более плотная структура, около 3/4 массы которой составляет белок, а 1/4 — смешанные липиды. Внутренняя мембрана, как правило, располагается параллельно наружной, по всей окружности частицы, но характеризуется присутствием больших направленных внутрь складок (инвагинаций), называемых *кристами* (рис. 12.7). В митохондриях печени кристы составляют единое целое с внутренней мембраной; эта непрерывность менее очевидна в митохондриях из других источников. Внутренние поверхности крист, обращенные к матриксу, усеяны маленькими выступающими структурами, называемыми *элементарными тельцами* или *частицами внутренних митохондриальных мембран*. Эти частицы состоят

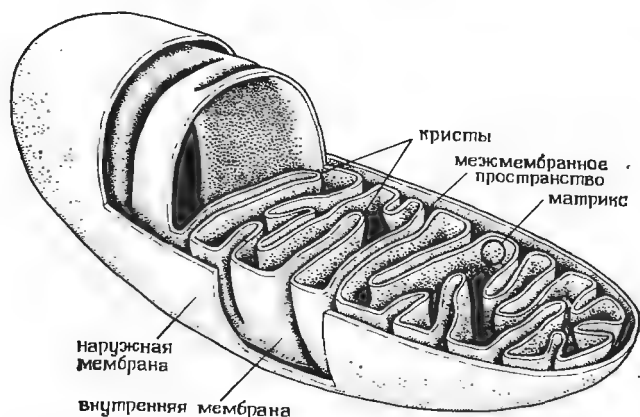
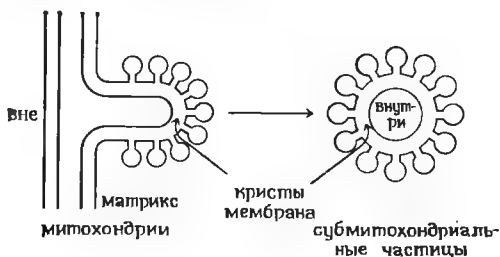


Рис. 12.7. Схематическое изображение митохондрии. Внутренняя сторона внутренней мембраны обращена к матриксу и усеяна выступающими структурными образованиями, которые в основном являются АТФ-синтетазой. В матриксе растворены дегидрогеназы цикла лимонной кислоты. В матриксе наряду с другими компонентами находятся рибосомы и митохондриальная ДНК. [Wolfe S., Biology of the Cell, Wadsworth Publishing Co., Belmont. Calif., 1974.]

из сферических головок, соединенных с мембраной тонкими перемычками. Итак, различают следующие основные отделы митохондрий: *наружная мембрана*, *межмембранное пространство*, *внутренняя мембрана*, отделяющая межмембранное пространство от *матрикса* (рис. 12.7). Поскольку митохондрии печени содержат много ферментов, не относящихся к циклу лимонной кислоты или переносу электронов, кристы в них неплотно упакованы. Митохондрии сердечной мышцы, в которых почти не происходит иных процессов, кроме реакций цикла лимонной кислоты, окисления жирных кислот и переноса электронов, характеризуются исключительно плотноупакованными кристами.

Несколько типов субмитохондриальных препаратов сослужили службу в изучении функции митохондрий. Разрыв наружной мембраны может быть осуществлен посредством осмотического шока или обработки *фосфолипазой*. Таким образом, освобождается для исследования межмембранная жидкость. Более плотная, чем наружная, внутренняя мембрана и ограничиваемый ею матрикс могут быть отделены с помощью центрифугирования в градиенте плотности. Внутреннюю мембрану удастся разорвать при ее обработке такими детергентами, как дигитонин или дезоксихолат. В результате освобождаются составляющие матрикса, например ферменты цикла лимонной кислоты, а также удаляется большая часть цитохрома *c* и солюбилизируются различные компоненты мембраны. Если мембрана на короткое время подвергается воздействию ультразвуковых колебаний, получают субмитохондриальные частицы, изображенные ниже. Это пузырьки, имеющие вывернутую наизнанку по отношению к внутренней мембране интактных митохондрий конфигурацию.



Такие пузырьки образуются при разрыве и вторичном замыкании внутренней мембраны, причем выступающие элементарные частицы находятся теперь на наружной поверхности пузырьков. В пузырьках заключена жидкость, представляющая собой смесь содержимого исходного матрикса, межмембранного пространства и среды, в которой находились митохондрии. Образуются такие пу-

зырьки в среде с необходимым составом, можно «загрузить» пузырьки определенными материалами. Эти субмитохондриальные частицы все еще могут переносить электроны от NADH и сукцината к O_2 , и они сохраняют свойство сопрягать этот перенос с образованием АТР. Использование указанных методов также позволило определить локализацию различных ферментов в митохондриальных отделах (табл. 12.1).

Химический состав митохондрий. Наружная мембрана митохондрий печени служит в качестве защитного покрова специализированного функционального аппарата — крист. Этот покров напоминает эндоплазматическую сеть гепатоцитов по общему химическому составу, а именно распределению фосфолипидов, и содержит несколько (но не все) ферментов из числа связанных с микросомами, приготовленными из клеток гепатоцитов, например NADH-цитохром b_5 -редуктазу (гл. 3) и глюкозо-6-фосфатазу (разд. 14.3.1). Эта мембрана служит в качестве легкопроницаемого барьера для молекул, имеющих молекулярную массу $\sim 10\,000$.

Высокогидрофобный липидный бислой внутренней мембраны состоит преимущественно из холин- и этаноламинсодержащих фосфолипидов; фосфолипиды, в состав которых входят серин, инозит и глицерин, присутствуют в меньшем количестве.

Митохондрии сердца содержат много фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, в то время как в митохондриях печени они фактически отсутствуют. Около двух третей всех жирных кислот в той или иной степени ненасыщены; в наружной мембране их относительные концентрации в два раза ниже, чем во внутренней. Почти весь кардиолипин (гл. 3) клетки находится во внутренней митохондриальной мембране, составляя около одной пятой всех липидов. Это антигенный липид; однако антитела к кардиолипину не могут реагировать с препаратами внутренних мембран или с пузырьками, приготовленными из этих мембран. Отсюда следует, что молекулы кардиолипина погружены в мембрану и поэтому недоступны для антител. Уплотненная структура внутренней мембраны, ее проницаемость и особенности свойств содержащихся в ней ферментов обусловлены исключительно высокой гидрофобностью мембраны и природой ее липидного бислоя. Хотя свойства ферментов, когда они очищены и помещены в водную среду, представляют несомненный интерес, по-настоящему важным является их поведение в безводной гидрофобной липидной среде мембраны. Примечательно, что некоторые из ферментов никогда не удается полностью освободить от липидов, и даже когда β -оксибутиратдегидрогеназу удалось освободить от липида, фермент в такой форме был уже не в состоянии катализировать реакцию, как это происходит в мембране (разд. 12.4.1).

Таблица 12.1

Локализация некоторых ферментов в митохондриях

Наружная мембрана	Межмембранное пространство	Внутренняя мембрана	Матрикс
Цитохром b_5	Аденилаткиназа	Цитохромы b , c_1 , c , a , a_3	Пируватдегидрогеназа
Цитохром b_5 -редуктаза	Нуклеозиддифосфокиназа	NADH-дегидрогеназа	Цитрат-синтаза
Моноаминоксидаза	Сульфитоксидаза	Сукцинатдегидрогеназа	Аконитаза
Кинуренингидроксилаза		Убихинон	Изоцитратдегидрогеназа
Ацил-CoA-синтетаза жир- ных кислот		Флавопротеид, переносящий электроны	Фумараза
Система удлинения цепи жирных кислот		АТРаза	α -Кетоглутаратдегидроге- наза
Глицерофосфат-ацилтран- сфераза		β -Оксibuтиратдегидроге- наза	Малатдегидрогеназа
Холлнфосфотрансфераза		Карнитин-пальмитоилтранс- фераза	Система окисления жирных кислот
Фосфолипаза A		Система удлинения цепи жирных кислот	Фосфонолпируваткарбо- ксилаза
Нуклеозид-дифосфокиназа		ADP-ATP-транслоказа	Глутаматдегидрогеназа
		Pi-OH-транслоказа	Аспартат-глутаматамино- трансфераза
		Дикарбоксилаттранслоказа	Орнитин-карбонмилтранс- фераза
		Трикарбоксилаттранслоказа	
		α -Кетоглутараттранслоказа	
		Пируваттранслоказа	
		Глутамат-аспартаттрансло- каза	

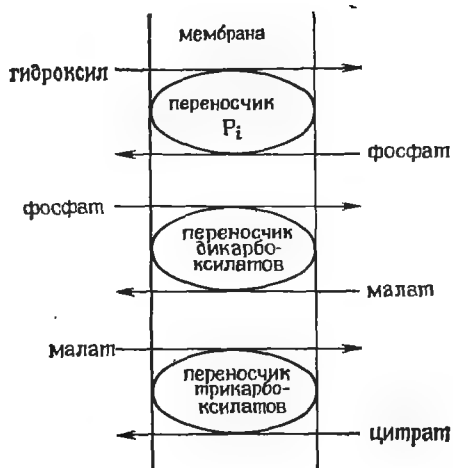
12.3.1. Перенос через внутреннюю митохондриальную мембрану

Митохондрии, суспендированные в растворе непроникающих веществ, ведут себя как прекрасные осмометры. Внутренняя мембрана, в сущности, непроницаема для молекул более крупного размера и для всех заряженных ионов. Вода, маленькие нейтральные молекулы (O_2 и NH_3 , но не H^+ , OH^- или NH_4^+) и несколько «проникающих» анионов (Cl^- и ацетат $^-$, если им сопутствуют катионы) могут самопроизвольно входить в матрикс или выходить из него. В принципе движение веществ внутрь матриксного пространства может осуществляться быстро, но происходит оно в основном как активный транспорт или облегченный обмен. Оба процесса совершаются с участием специфических высокоспециализированных белков. Такие белки называют носителями или транслоказами (разд. 11.3.2), большинство из них функционирует по типу *антипорта*, т. е. движение вещества через мембрану становится возможным только в обмен на какое-либо довольно специфическое вещество, имеющее тот же заряд, но двигающееся в обратном направлении, например ADP обменивается на АТР. Для транспорта с помощью транслоказы (носителя) не требуется никакой дополнительной энергии извне. По крайней мере одна из пары транспортируемых молекул, движение которой осуществляется по типу антипорта (обмена), должна двигаться вниз по значительному концентрационному градиенту. Следует отметить, что таким образом выход какого-либо основного компонента клетки по концентрационному градиенту, будь то через митохондриальную или плазматическую мембрану, может управлять движением идущего навстречу вещества против его градиента, т. е. совершать «работу» до тех пор, пока обе движущие силы не уравниваются. На рис. 12.8 показано расположение нескольких участвующих в одной последовательности переносчиков.

Считают, что переносчик фосфата обменивает P_i на OH^- , хотя формально этот процесс невозможно отличить от совместного транспорта (*симпорта*) с H^+ . Транспорт P_i — процесс с насыщением; K_m понижается вместе с возрастанием кислотности. Переносчик обладает по крайней мере одной необходимой сульфгидрильной группой. Реакция с такими сульфгидрильными реагентами, как N-этилмаленимид, останавливает транспорт P_i .

Метаболическая роль процессов, катализируемых носителями ди- и трикарбоксилатов, обсуждается немного позднее. Здесь необходимо лишь заметить, что для работы цикла лимонной кислоты требуется только облегченный вход пирувата. Поступление малата из цитозоля — это источник дополнительных восстановительных эквивалентов (разд. 12.4.1) и способствует глюконеогенезу (разд. 14.6). Выход цитрата — средство для экспортирования

Рис. 12.8. Схема последовательного действия переносчиков при транспорте метаболитов через митохондриальную внутреннюю мембрану. [Fonyo A., Palmieri F., Quagliariello E., Horiz. Biochem. Biophys., 2, 60—105, 1976.]

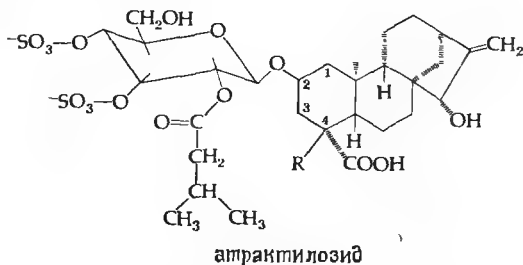
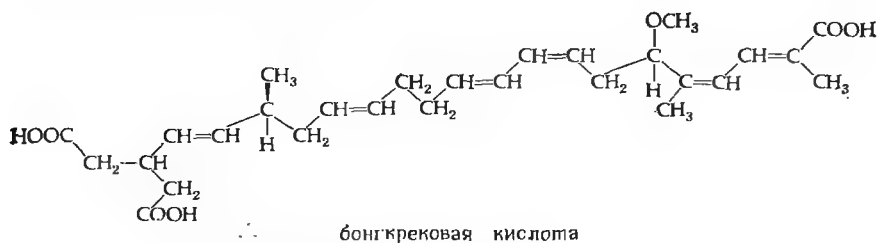


ацетильных групп (разд. 14.5.1). Носитель дикарбоксилатов обменивает P_i на малат, малат — на другие дикарбоксилаты, включая малонат, и P_i — на P_i , но не на OH^- . Транспорт дикарбоксилатов, но не P_i ингибируется замещенными малонатами.

Переносчик трикарбоксилатов транспортирует цитрат, изоцитрат, аконитат и такие дикарбоксилаты, как малат и сукцинат (не малонат), а также фосфоенолпируват (разд. 14.4.2); в каждом случае две карбоксильные группы находятся в *цис*-конфигурации. Особая природа этого переносчика отчетливо видна из его неспособности транспортировать P_i и его подверженности ингибирующему воздействию ряда трикарбоксилатных соединений. Отдельный белок участвует в обмене α -кетоглутарата на малат, сукцинат или малонат. Переносчик пирувата, напротив, обменивает пируват только на ион OH^- (или симпортирует с H^+). Этот процесс в экспериментальных условиях ингибируется несколькими реагентами, особенно α -циано-4-оксидиннаматом, который, по-видимому, весьма специфичен для этого процесса. Есть еще одна группа переносчиков, которые, очевидно, специфичны для глутамата, обменивая эту аминокислоту соответственно на аспарагиновую кислоту, глутамин и особенно на OH^- .

ADP-ATP-транслоказа импортирует внутрь матриксного пространства ADP, который должен фосфорилироваться митохондриальным устройством, сопрягающим этот процесс с окислением, а затем экспортирует ATP обратно из митохондрии. Этот переносчик впервые обнаружен при попытках понять механизм действия *атрактилозида*, который в низких концентрациях препятствует митохондриальному окислительному фосфорилированию. Позднее сходные эффекты были описаны для бонгкрековой кислоты. Оба эти вещества, а также карбоксиаатрактилозид в наномолярных кон-

центрациях прочно связываются с внутренней мембраной, оказывая таким образом окислительное фосфорилирование. ADP-АТР-транслоказа составляет ~5% мембранного белка. В мембране имеется один или два атрактилозидсвязывающих центра на один цитохром *a* (разд. 12.4.1):



Изолированный из клетки переносчик — димер, состоящий из идентичных субъединиц, каждая из которых имеет молекулярную массу 30 000. Этот белок не имеет открытой сульфгидрильной группы. Однако при связывании одной молекулы ADP обнажается одна SH-группа. До сих пор не получило объяснения мощное ингибирование транслоказы CoA-производными жирных кислот с длинной цепью, например пальмитоил-CoA. Хотя липид составляет только одну четверть мембранной массы, его значимость для действия ADP-АТР-транслоказы иллюстрируется тем фактом, что при замене ненасыщенных жирных кислот фосфоглицеридов мембраны насыщенными жирными кислотами скорость транслокации адениннуклеотида замедляется на 70—90%, хотя число центров переноса остается неизменным.

Молекулярный механизм действия адениннуклеотидтранслоказы недостаточно изучен. Хотя она обменивает АТР_{внутр} на АТР_{внеш}, когда во внешней среде присутствует АТР, а не ADP, при наличии смеси ADP и АТР все же обнаруживается большое предпочтение к ADP, вероятно, потому, что последний имеет на один отрицательный заряд меньше, чем АТР. Адениннуклеотидтранслоказа претерпевает значительные конформационные изменения при

связывании ее субстратов, которое заметно не только по обнаружению ранее скрытой сульфгидрильной группы, но также по физическому уплотнению мембраны. Наблюдения наводят на мысль о том, что внутренний «выход» от транслоказы очень близок к месту синтеза АТФ; например, вновь импортируемый АДФ используется предпочтительнее, чем тот, который находится в смешанном фонде нуклеотидов в матриксе. Скоростью оборота транслоказы (~ 2000 молекул субстрата в минуту при 20°C) может определяться верхний предел скорости образования митохондриального АТФ.

Адениннуклеотидтранслоказа участвует в системе, поддерживающей более высокое отношение АТФ/АДФ в цитозоле, чем в митохондриальном матриксе. Энергия, необходимая для функционирования этой системы, поставляется тем же процессом, который приводит к синтезу АТФ. Для работы таких переносчиков, как, например, переносчики дн- и трикарбоксилатов, специального снабжения энергией, по-видимому, не требуется, но транслоказы P_i и пирувата, которые либо производят обмен на OH^- -ионы, либо осуществляют котранспорт H^+ -ионов, должны были бы непрерывно генерировать ΔpH на мембране, если бы не происходил противоток протонов в межмембранное пространство, осуществляемый другими системами. Именно этот последний процесс и предоставляет энергию, необходимую для селективного входа P_i и пирувата в митохондриальный матрикс.

Понимание процесса движения катионов через внутреннюю мембрану находится на несколько менее удовлетворительном уровне. Предполагается, что для Na^+/K^+ - и $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -обменов существуют ионофоры (возможно, транслоказы); однако в подтверждение такого предположения получено мало данных. Фермент, эквивалентный Na^+/K^+ -АТФазе (разд. 11.3.2), не был обнаружен в митохондриях. Однако полагают, что в них имеется носитель для K^+/H^+ -обмена. Во внутренней мембране, например, нет Ca^{2+} -АТФазы, сравнимой с таковой в саркоплазматической сети (гл. 36), но имеется механизм $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ -обмена; возможность же входа Ca^{2+} в матрикс тоже обусловлена гидролизом АТФ. Оказавшись внутри, Ca^{2+} связывается очень прочно со специальным гликопротеидом матрикса и может оказывать заметное влияние на метаболические процессы: например, в присутствии Ca^{2+} отношение NADH/NAD^+ в матриксе увеличивается, а фосфатаза пируватдегидрогеназы активируется.

Депептиды, такие, как антибиотик валиномицин, продуцируемый одним из штаммов *Streptomyces*, оказались необычайно полезными при исследовании этих взаимосвязей. K^+ спонтанно и обратимо связывается во внутренней полости молекулы этого макролида (рис. 12.9). Валиномицин проникает через липидные участки внутренней митохондриальной мембраны и плазматической

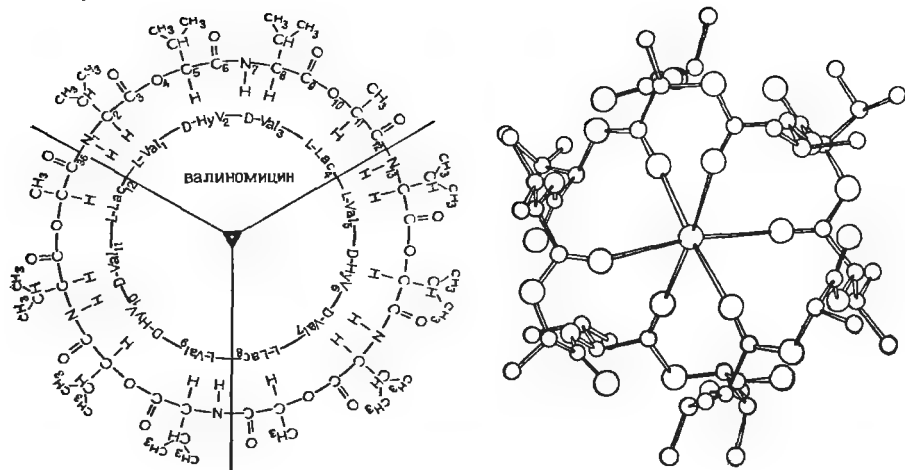
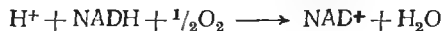


Рис. 12.9. Циклическая структура валиномицина, образуемая трижды повторяющейся единицей L-валин $\rightarrow$ D- α -оксивалериановая кислота (HyV) $\rightarrow$ D-валин $\rightarrow$ L-лактат (L-Lac), так что эфирные и пептидные связи чередуются. Трехмерная модель, построенная из шариков и палочек, показывает, что K^+ связывается шестью карбонильными группами. (Взято с изменениями из работы [Smith J. D., Duax W. L., Langs D. A., De Titta J. T., Edmonds J. W., Rohrer D. C., Weeks C. M., J. Am. Chem. Soc., 97, 7243, 1975.]

мембраны почти всех клеток. Следовательно, небольшое количество валиномицина может «переправлять» большие количества K^+ через мембрану и уравнивать концентрацию $[K^+]$ по обе стороны мембраны. Природный эквивалент валиномицина в животных клетках неизвестен.

12.4. Перенос электронов

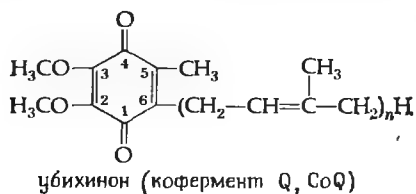
Электроны переносятся от субстратов к NAD^+ дегидрогеназам, находящимися в митохондриальном матриксе, и к флавиновым нуклеотидам — дегидрогеназам, которые либо находятся в матриксе (ацил-CoA — дегидрогеназы жирных кислот), либо погружены во внутреннюю мембрану (дегидрогеназы сукцината, глицеролфосфата, саркозина). АТФ образуется во время движения электронов от этих восстановленных нуклеотидов к O_2 . Для реакции



$\Delta E'_0 = 1140$ мВ и, таким образом, $\Delta G^\circ \approx -51\,000$ кал/моль. Для восстановления O_2 в присутствии донора электронов $FADH_2$ эти же величины равны: $\Delta E'_0 = 790$ мВ и $\Delta G^\circ \approx 35\,000$ кал/моль. В прева-

лирующих в митохондриальном матриксе условиях, т. е. при относительно низких $[ADP]$ и $[P_i]$ и относительно высокой $[ATP]$, ΔG , требующаяся для синтеза АТР, составляет примерно 12 000—14 000 кал/моль; следовательно, окисление 1 моля восстановленных нуклеотидов может обеспечивать образование ~ 3 и 2 молей АТР соответственно. Ниже обсуждается, как это происходит.

Наряду с пиридин- и флавииннуклеотидными коферментами обратимое восстановление и окисление претерпевают и некоторые содержащиеся в мембране компоненты, которые относятся к иным классам соединений. Негемовые железопротеиды $[(FeS)\text{-белки}]$ уже описывались при обсуждении свойств сукцинатдегидрогеназы (разд. 12.2.2) и детально рассматриваются в разд. 13.2.1. Вероятно, дюжина таких веществ функционирует в митохондриальной электронпереносящей цепи. **Убихинон** и его гидрохинон — широко распространенная окислительно-восстановительная пара, но не связанная, подобно коферментам, со специфическими белками. Вместо этого небольшой фонд указанного соединения находится в липидной фазе мембраны, где он служит в качестве акцептора электронов для одной группы ферментов и в качестве донора электронов для другой, следующей группы ферментов цепи. Таким образом, убихинон представляет собой мобильный жирорастворимый субстрат, доступный для соответствующих ферментов, более жестко встроенных в мембранную структуру:



В убихиноне, полученном из различных биологических источников, n в приведенной выше формуле варьирует от 6 (у некоторых дрожжей) до 10 (в печени млекопитающих). При частичном восстановлении убихинон образует относительно стойкий семихинон и, следовательно, может участвовать в одноэлектронном переносе, а также может подвергаться двухэлектронному восстановлению до гидрохинона.

Цитохромы, которые более подробно рассматриваются в гл. 13, представляют собой **гемопротеиды**, т. е. белки, с каждым из которых связан **гем** или железопорфирин (рис. 12.10). Химия порфиринов обсуждается в гл. 31. Отдельные цитохромы отличаются друг от друга по своим белкам, природе боковых цепей их порфиринов и по способу присоединения гема к белкам. Цитохром *c* — наиболее изученный представитель группы цитохромов. Из всех мито-

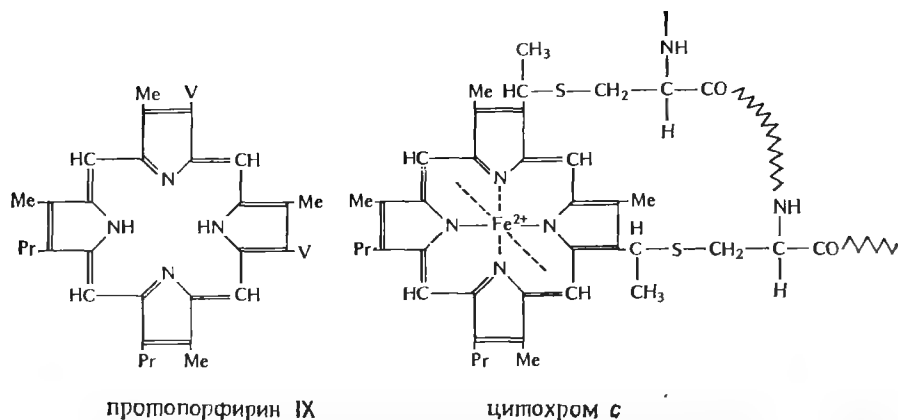


Рис. 12.10. Протопорфирин IX и цитохром с. Иминогруппы пиррольных компонентов молекулы придают им свойства слабых кислот. При введении Fe^{2+} образуется гем за счет замещения обоих атомов водорода в иминогруппах. Ион металла присоединен к плоскому порфириновому кольцу двумя ковалентными и двумя координационными связями. Железопротопорфирин IX и есть гем. Два заряда Fe^{2+} электрически нейтрализуются за счет анионной формы двух пиррольных колец. Вся молекула, будучи окислена до состояния Fe^{3+} (ферригем), несет положительный заряд, который должен уравниваться анионом среды. В цитохроме с винильные боковые цепи в положениях 2 и 4 восстановлены в результате присоединения —SH-группы к двойным связям, причем сульфгидрильные группы принадлежат цистеиновым остаткам в положениях 14 и 17 белковой цепи; таким образом, возникает ковалентная связь порфиринового кольца с белком. Два аминокислотных остатка находятся между этими цистеиновыми остатками. Атом железа имеет два дополнительных, доступных для лигандов положения (обозначенные штрихами) под и над плоскостью кольца. Эти положения заполнены атомом серы метионил-80 и имидазольным азотом гистидил-18 (рис. 12.11). Окисление ферроцитохрома с до феррицитохрома с не меняет распределение лигандов вокруг атома железа. Ме — метиловые; Р — пропионовые; V — винильные боковые цепи.

хондриальных цитохромов только цитохром с экстрагируется водными растворителями, будучи слабо прикреплен к внешней поверхности внутренней мембраны. Цитохром с млекопитающих имеет единственную цепь со 104 остатками (мол. масса 12 400), с которой ковалентно связывается гемовый остаток, как это показано на рис. 12.10.

Железо в феррицитохроме с может восстанавливаться и вновь окисляться. Ферроцитохром с — это диамагнитный белок (не имеет неспаренных электронов); в отличие от феррогемоглобина он не связывается с O_2 или с CO, а также самопроизвольно не окисляется в присутствии O_2 . На рис. 12.11 представлена последовательность аминокислот цитохрома с из сердца человека. Трехмерная структура этого белка показана на рис. 4.1.

Рентгеноструктурный анализ кристаллического цитохрома с лошади указывает на то, что гемовый остаток находится внутри гид-

рофобной щели, почти полностью покрытой белком. Так как только край плоскости порфирина обращен к среде и все координационные связи железа полностью использованы, реагенты не могут непосредственно взаимодействовать с металлом. Поэтому электроны должны входить в структуру и покидать ее по какому-то каналу, возможно двигаясь по выступающему краю порфирина.

Различные цитохромы идентифицируют по спектрам поглощения их восстановленных форм. В процессе функционирования они поочередно восстанавливаются мембранным компонентом с более низким потенциалом и вновь окисляются компонентом с более высоким потенциалом. Из всех цитохромов цитохром *b*, который также содержит железопроtopорфин IX в качестве простетической группы, имеет самый низкий потенциал, который увеличивается в последовательности от цитохромов *c* и *c*₁ к цитохромам *a* и *a*₃. Последняя пара составляет цитохромоксидазу — содержащий медь белок, связанный со специальной формой гема (разд. 13.3). Восстановленный цитохром *a*₃ — единственный компонент митохондрий, который способен легко восстанавливать молекулярный кислород; это главный механизм восстановления кислорода в тканях млекопитающих.

12.4.1. Электронпереносящая цепь

Если митохондрии или субмитохондриальные частицы анаэробно инкубируют с промежуточными продуктами цикла лимонной кислоты, то NAD^+ , флавины, негеминное железо, убихиноны и цитохромы *b*, *c*₁, *c*, *a* и *a*₃ подвергаются восстановлению. Исследования, направленные на выяснение вопроса о последовательности

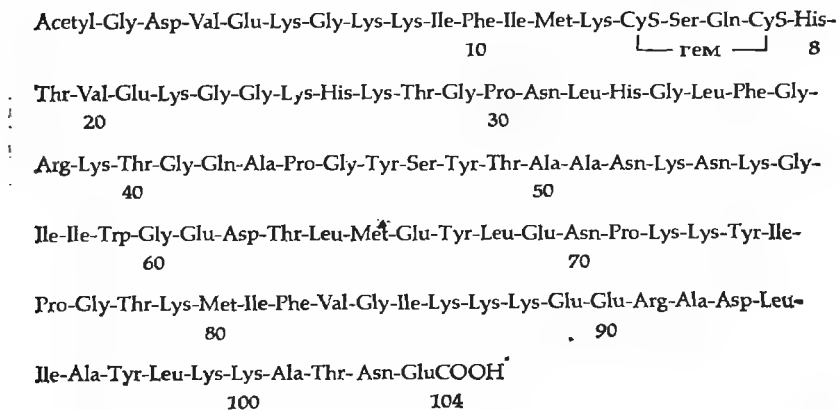


Рис. 12.11. Аминокислотная последовательность цитохрома *c* из сердца человека. [Matsubara H., Smith E. L., J. Biol. Chem., 237, PC 3575, 1962.]

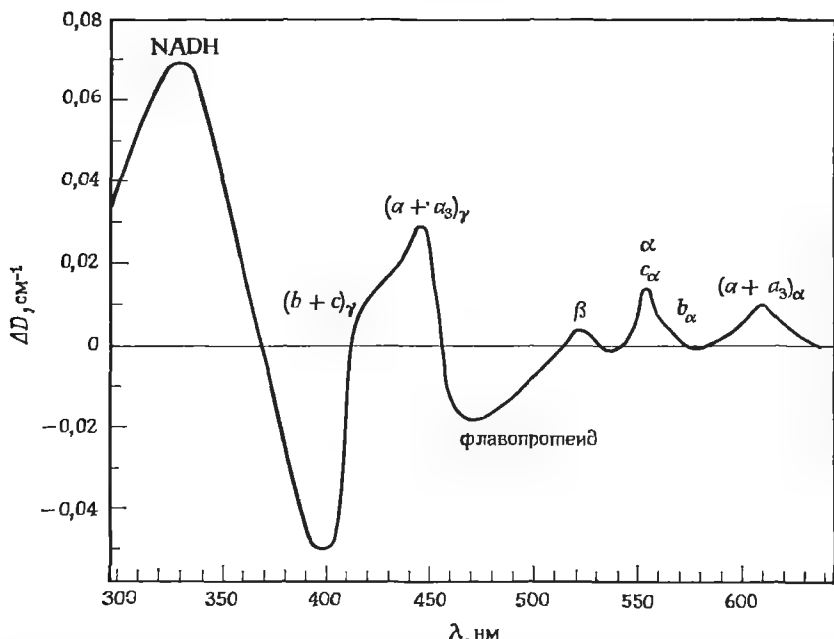


Рис. 12.12. Разностный спектр поглощения анаэробных и аэробных митохондрий из печени морской свинки. Кривая показывает изменение оптической плотности суспензии митохондрий при каждой длине волны в приведенном диапазоне, которое вызывается полным отсутствием кислорода. Восстановление негеминового железа должно привести к варьирующему уменьшению оптической плотности во всем диапазоне спектра с максимальным падением при приблизительно 450 нм. Восстановление убихиона не может быть заметно в показанном спектральном диапазоне. (Любезно предоставлено д-ром Б. Чансом и д-ром Д. Истабруком.)

переноса электрона между этими компонентами, в основном были выполнены с помощью спектрофотометрии, как это проиллюстрировано на рис. 12.12, спектроскопии и метода электронного парамагнитного резонанса (разд. 10.2), который оказался особенно пригодным для изучения белков, содержащих негеминное железо. Установление локусов действия арсенала различных ингибиторов имело решающее значение для успеха этих исследований. Например, было установлено, что ротенон, относящийся к группе инсектицидов, ингибирует NADH-дегидрогеназу; барбитураты, например амитал, препятствуют восстановлению убихиона; пирицидин А и нордигидрогваяретовая кислота предотвращают восстановление цитохромов под действием NADH; теноилтрифторацетон препятствует восстановлению цитохрома *b* сукцинатом; антимицин А (антибиотик из *Streptomyces griseus*) блокирует повторное окисление цитохромов *b*; цианид, H_2S и азид связываются с окисленным ге-

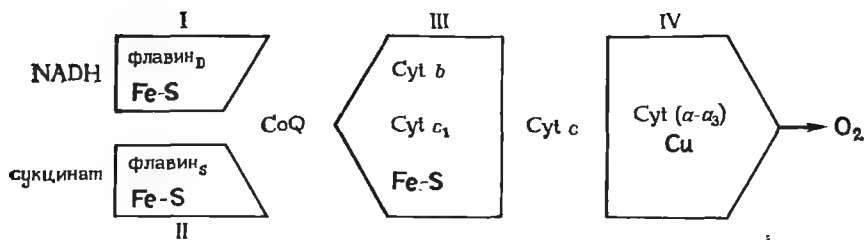
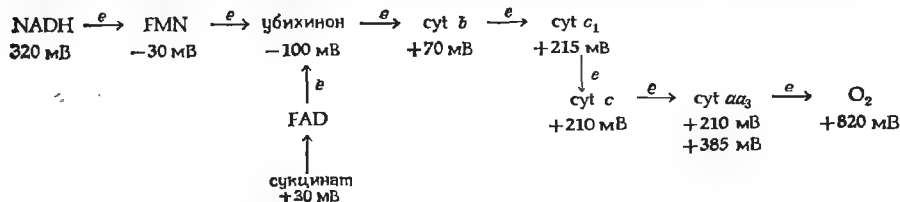


Рис. 12.13. Комплексы, выделенные из митохондрий и участвующие в митохондриальном транспорте электронов. (Приведено с изменениями из работы [Green D. E., Goldberger R. F., *Molecular Insights into the Living Process*, Academic Press, Inc. New York, 1967].)

миновым железом цитохромов *a* и *a*₃ и предотвращают их восстановление, не влияя на восстановление любого другого компонента.

На основании экспериментов, где применялись ингибиторы еще до появления метода ЭПР, сделан вывод, что в общих чертах движение электронов в митохондриях происходит следующим образом:



Для каждого компонента электронпереносящей цепи внизу указаны значения E_0 . Предполагается, что все флавопротеиды, находящиеся в мембране, будучи восстановлены, окисляются также фондом убихинона (CoQ) и таким образом присоединяются к основной электронпереносящей цепи.

Как показано на рис. 12.13, полученные после обработки детергентами субмитохондриальные частицы можно разделить на пять основных комплексов, катализирующих следующие реакции:

I: $\text{NADH} \xrightarrow{e^-} \text{убихинон}$; II: $\text{сукцинат} \xrightarrow{e^-} \text{убихинон}$; III: $\text{дигидроубихинон} \xrightarrow{e^-} \text{феррицитохром } c$; IV: $\text{ферроцитохром } c \xrightarrow{e^-} \text{O}_2$; V: $\text{ATP} \xrightarrow{e^-} \text{ADP} + \text{P}_i$. Поскольку каждый комплекс частиц сохраняет некоторые из мембранных липидов, масса выделенных комплексов (табл. 12.2) превышает ожидаемое значение, соответствующее их теоретическому составу.

Эти полученные экспериментально субмитохондриальные частицы отражают реальную структуру самой мембраны; каждый

комплекс состоит из нескольких различных субъединиц, при сборке которых образуется единая функциональная единица. Комплексы разделены мембранными липидами. Если учесть, что ансамбль

Таблица 12.2
Компоненты главной дыхательной цепи

Комплекс	Компоненты	Масса частиц	Относительное содержание в мембране	Реакция
I	1 FMN, 16 (FeS) Убихинон	550 000	1 64	$\text{NADH} \xrightarrow{e^-} \text{убихинон}$
III	4 цитохром <i>b</i> , 2 цитохром <i>c</i> , 8 или 12 (FeS) Цитохром <i>c</i>	250 000 12 000	4 8	Дигидроубихинон $\xrightarrow{e^-}$ цитохром <i>c</i>
IV	Цитохром <i>aa</i> ₃ , 2 Cu ²⁺	200 000	8	Ферроцитохром <i>c</i> $\xrightarrow{e^-} \text{O}_2$

комплексов в целом содержит функционально связанную с ним АТФазу (комплекс V), равно как и переносчики адениннуклеотидов и Р_i, то можно рассчитать, что «молекулярная масса» такого функционального ансамбля, включающего также одну FMN-содержащую NADH-дегидрогеназу, должна составлять $\sim 5 \cdot 10^6$.

Метод ЭПР использовали для обнаружения и характеристики специфических белков, содержащих негеминное железо; при этом учитывали значения *g* и тонкую структуру спектров ЭПР при различных температурах и pH. Это привело к обнаружению нескольких центров, содержащих негеминное железо, в комплексах I—III. Например, в одном только комплексе I было выявлено по крайней мере четыре, а возможно и шесть, отчетливо различных центров; приводимые различными авторами значения потенциала этих центров не совпадают. Поскольку каждый белок может иметь более чем один такой центр, неизвестно, сколько таких белков находится в каждом комплексе. В самом деле, в комплексе I при фракционировании более подходящими методами обнаруживается не менее семи различных белков с массой от 25 000 до 75 000. Кроме того, центры негеминного железа найдены в комплексах II и III.

Рис. 12.14 помогает понять взаимосвязь между компонентами электронпереносящей цепи с точки зрения их окислительно-восстановительных потенциалов. Комплексы I—III осуществляют электрический контакт с соответствующими окислительными комплексами через центр негеминного железа (FeS). Это также справедливо для других флавопротеидов, которые имеют доступ к электронпереносящей цепи. Окислительно-восстановительные потенциа-

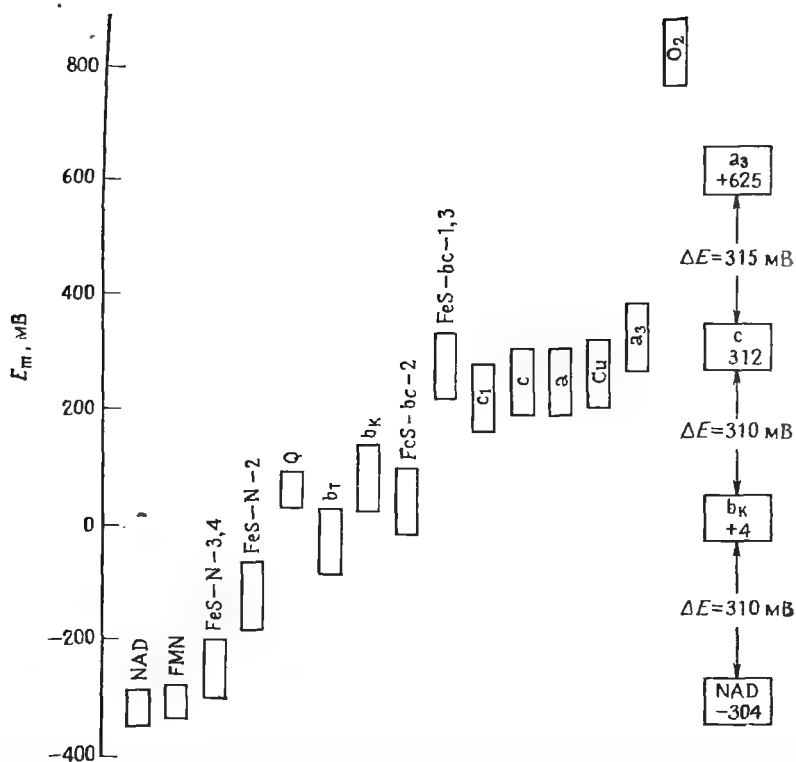


Рис. 12.14. Окислительно-восстановительные потенциалы компонентов дыхательной цепи. Каждый прямоугольник обозначает окислительно-восстановительный потенциал данного компонента в диапазоне от 9 до 91% полного восстановления. Центр прямоугольника совпадает с потенциалом средней точки E_m этого компонента, шкала которого показана слева. Справа показаны действительные E некоторых ключевых членов дыхательной цепи, обнаруженные при наблюдении митохондрий из сердца голубя в состоянии 4 (см. табл. 12.5) при дыхании на β -оксипутирате и низкой [ADP]; показаны также перепады потенциала ΔE между компонентами данной системы в указанных условиях. [Wilson D. F., Ditton P. L., Erecinska M., Lindsay J. G., in: G. F. Azzone, L. Ernster, S. Papa, E. Quagliariello, N. Sillorandi, eds., *Mechanisms in Bioenergetics*, p. 530. Academic Press, New York, 1973; Wilson D. F., Erecinska M., Owen L. S., Mela L., in: L. Ernster, R. W. Estabrook, E. C. Slater, eds., *Dynamics of Energy-transducing Membranes*, p. 225, Elsevier Scientific Company, Amsterdam, 1974; дополнительные данные любезно предоставлены проф. Байнертом.]

лы (FeS)-центров в каждом комплексе создают внутри его падение потенциалов от 250 до 300 мВ, но вместе с тем разность потенциалов между самым высокопотенциальным компонентом одного комплекса и самым низкопотенциальным компонентом соседнего комплекса сравнительно невелика. На рисунке не указано, что значения кажущейся E_m для нескольких компонентов существенно

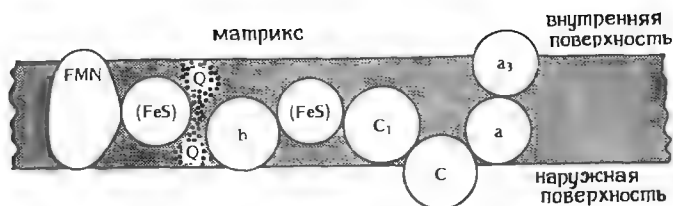


Рис. 12.15. Схема организации основных компонентов электронпереносящей цепи $\text{NADH} \rightarrow \text{O}_2$. Только цитохром c легко удаляется водными растворителями. Все другие белки являются интегральной частью мембраны. Значительная часть цитохрома c находится на наружной поверхности мембраны, а NADH -дегидрогеназа и цитохром a_3 — на внутренней поверхности, где они реагируют соответственно с NADH и O_2 . Указаны только относительные положения без соблюдения масштаба; кроме того, не показаны липидные молекулы.

сдвигаются при воздействии АТФ в близких к анаэробным условиям: E_m для цитохрома a_3 уменьшается на 225 мВ, для формы b_i цитохрома b увеличивается на 275 мВ, для цитохрома c уменьшается на 50 мВ и для цитохрома a увеличивается на 50 мВ. Этот рисунок также показывает, что в митохондриях сердца голубя, окисляющих β -оксibuтират при низкой $[\text{ADP}]$, разность ΔE между основными компонентами каждого из трех комплексов составляет 310—315 мВ. Высокое значение E_m для цитохрома a_3 отражает тот факт, что не более 0,1% цитохрома a_3 в этих условиях находится в восстановленном состоянии, в результате чего E для цитохромоксидазы приближается к +625 мВ, т. е. по крайней мере на 250 мВ превышает E'_0 .

Как следует из уравнения $\Delta G = nF\Delta E$, при $\Delta E = 312$ мВ ΔG для каждого из главных перепадов потенциала должна составлять —14 000 кал/моль. Это значение можно сравнить с ΔG для синтеза АТФ при тех же концентрациях $[\text{ATP}]$, $[\text{ADP}]$ и $[\text{P}_i]$. Если намеренно поддерживать низкую концентрацию $[\text{ADP}]$, так чтобы отношение $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ было очень высоким, тогда ΔG для синтеза АТФ должна составлять +14 600 кал/моль, как это можно рассчитать, принимая для реакции $\text{ATP} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{P}_i$ $\Delta G^\circ = +8400$ кал/моль. Примечательно, что свободная энергия, которая становится доступной в результате процесса переноса электронов через каждый комплекс, приблизительно равна энергии, требующейся для синтеза АТФ в этих условиях, т. е. такое преобразование энергии при наличии необходимых средств может стать легко обратимым.

Таким образом, возникает картина высокоупорядоченной физической организации, при которой во внутренней мембране каждый компонент физически встроен между своим восстановителем и окислителем, в результате чего создаются условия для потока электронов от субстрата через последовательно расположенные переносчики электронов к O_2 . Активный центр NADH -дегидрогеназы находится на мембране со стороны матрикса, как и центр для

кислорода на цитохроме a_3 . Цитохром c прикреплен на наружной стороне мембраны, в то время как убихинон (кофермент Q), вероятно, растворен в липидной фазе мембраны, как показано на рис. 12.15.

12.4.4.1. Окисление виемитохондриального NADH

Митохондриальный NAD в основном сосредоточен в жидкости матрикса, где он служит связующим звеном между окисляемыми субстратами и электронпереносящей цепью. Суммарное количество митохондриального NAD в 40 раз превышает количество цитохрома c . Прохождение образующегося в цитоплазме NADH через внутреннюю мембрану митохондрий печени фактически невозможно. Это ставит вопрос о механизме, посредством которого восстановленный в цитоплазме NAD может быть использован путем повторного окисления в митохондриях. Такой вопрос не возникает в случае дрожжей, митохондрии которых легко пропускают NADH, и, возможно, не очень важен для митохондрий мозга или сердца. Митохондрии мозга могут осуществлять гликолиз, а митохондрии сердца получают большую часть энергии путем окисления жирных кислот и ацетоацетата. Однако NADH образуется в печени и цитоплазме скелетной мышцы в количествах, которые превышают возможности любого известного способа использования, кроме повторного окисления. Эта проблема особенно очевидна в метаболизме глюкозы; четыре из шести дегидрогеназных реакций в окислении глюкозы относятся к циклу лимонной кислоты, пятая — дегидрирование пировиноградной кислоты, которое также происходит в митохондриальном матриксе. Однако шестая реакция, которая фактически предшествует всем остальным, представляет собой окисление глицеральдегид-3-фосфата с участием NAD^+ (разд. 14.4.2) и осуществляется в цитоплазме. Полагают, что повторное окисление образованного в этой реакции NADH совершается по челночному механизму: какое-то вещество может восстанавливаться цитоплазматическим NADH и образовавшаяся восстановленная форма этого вещества может пересекать митохондриальные мембраны, окисляться там ферментом, связанным с электронпереносящей цепью, и затем возвращаться в цитоплазму для повторения всего процесса. В летательной мышце мясных мух эту роль выполняет α -глицерол-3-фосфат. Диоксиацетонфосфат восстанавливается в цитоплазме глицерол-3-фосфат-дегидрогеназой и NADH. Полученный в результате α -глицерофосфат окисляется в митохондриях посредством совсем другой α -глицерофосфатдегидрогеназы, которая представляет собой флавопротеид. Так как диоксиацетонфосфат может возвращаться в цитоплазму, то сопряженное действие указанных ферментов завершает митохондриальное окисление цитоплазматического NADH, как показано на рис. 12.16.

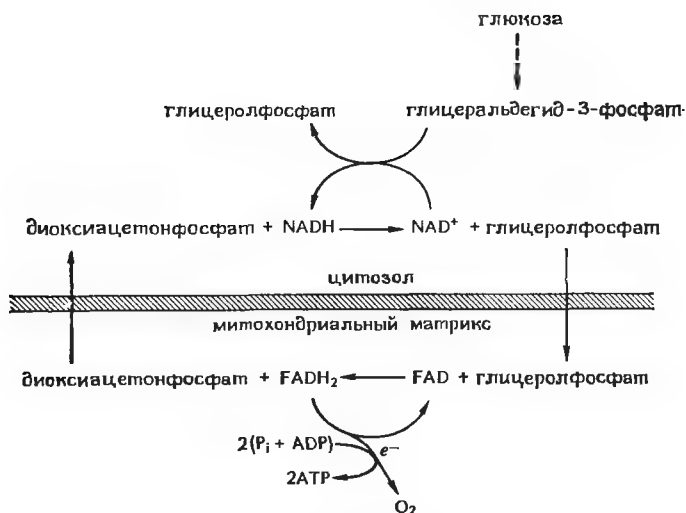


Рис. 12.16. Схематическое изображение действия глицеролфосфатного челнока, переносящего восстановительные эквиваленты от NADH цитозоля к митохондриальной электронпереносящей цепи.

Точно неизвестно, функционирует ли этот «челнок» в мышце млекопитающих, но составляющие его ферменты присутствуют там в количествах, которые согласуются с этим предположением. Ввиду того что возможность функционирования этого челнока в клетках печени казалась маловероятной, обратились к поискам других челночных устройств. Заманчивым в этом смысле казался челнок, который бы включал β-оксибутират — ацетоацетат, но его действие не было доказано. Несомненно, что этот механизм не мог бы действовать у жвачных животных, в печеночных митохондриях которых нет β-оксибутиратдегидрогеназы. С другой стороны, можно допустить действие такого механизма в красной мышце большинства позвоночных, так как содержание β-оксибутиратдегидрогеназы в митохондриях этой ткани в 10 раз выше, чем в тканях белой мышцы.

Многочисленные данные указывают на то, что в клетках печени и сердца действует более сложный малат-аспартатный челночный механизм, совершающий в конечном итоге перенос восстановительных эквивалентов от NADH цитоплазмы к NAD⁺ в митохондрии. Как показано на рис. 12.17, действие такого челнока становится возможным благодаря присутствию малатдегидрогеназы и глутамат-аспартатаминотрансферазы (гл. 21) как в цитозоле, так и в митохондриях, а также двух антипереносчиков — одного для глутамата и аспартата и одного для малата и α-кетоглут-

тарата. Установлено, что цитоплазматический NADH (считается, что он образуется, как показано на рис. 12.16) используется для восстановления оксалоацетата до малата; последний обменивается через мембрану на α -кетоглутарат и затем окисляется в митохондриальном матриксе обычным ферментом цикла лимонной кислоты. Однако образовавшийся таким образом оксалоацетат самостоятельно не может возвратиться обратно через мембрану. Это возвращение может быть тем не менее достигнуто посредством переаминирования при участии глутамата, которое приводит к образованию аспартата; последний обменивается на глутамат через мембрану. Переаминирование в цитозоле регенерирует оксалоацетат, что вызывает к действию следующий цикл. Поскольку процесс включает легко обратимые реакции, он происходит без расхода или потребления энергии; движущей силой является постоянное восстановление NAD^+ в цитозоле глицеральдегид-3-фосфатом, получающимся из глюкозы (гл. 14).

12.5. Окислительное фосфорилирование

Важнейшее значение процессов окисления углеводов и жирных кислот состоит в том, чтобы сделать доступной для клеток выделяющуюся свободную энергию окисления путем ее преобразования в форму, физиологически пригодную для использования в клеточных эндогенных процессах, а именно в форму АТФ. Окисление молекулы NADH одним атомом кислорода в митохондриях сопряжено с чистым выходом трех молекул АТФ, т. е. отношение P/O или $P/2e$ равно трем. Поскольку окисление субстратов, отда-

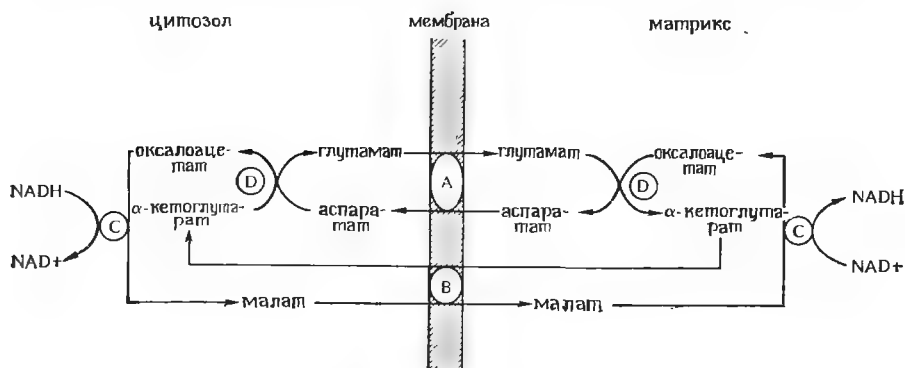


Рис. 12.17. Малат-аспартатный челнок, за счет которого восстановительные эквиваленты NADH цитозоля переносятся к NAD^+ митохондриального матрикса. А и В — антипортеры, С — малатдегидрогеназа, D — глутамат-аспартатаминотрансфераза.

ющих свои электроны NAD^+ , например β -оксибутирата или малата, также протекает с $P/O=3$, очевидно, что все генерируемое в ходе подобных реакций количество АТФ есть результат последующего повторного окисления NADH в организованной электронпереносящей системе митохондрий.

Многочисленные выполненные исследования были направлены на установление «пунктов» и механизмов аккумуляции энергии по пути передвижения электронов от NADH к O_2 . Установлено, что одна молекула АТФ образуется во время передвижения пары электронов от NADH к убихинону, вторая — когда восстановленный убихинон восстанавливает феррицитохром c , и третья — во время окисления ферроцитохрома c посредством O_2 . Таким образом, образование АТФ связано с электронпереносящими процессами, которые осуществляются в комплексах I, III и IV. Если учесть, что E_0 пары NADH/NAD^+ составляет -320 мВ, а пары сукцинат/фумарат $+30$ мВ, то становится очевидным, что сукцинат не только не может восстанавливать NAD^+ , но не приходится ожидать и образования АТФ при восстановлении убихинона сукцинатом, поскольку, как уже отмечалось, для синтеза АТФ требуется $\Delta E \approx 250$ мВ. Отсюда следует, что окисление сукцината, который поставляет электроны в основную цепь на уровне убихинона, вызывает образование АТФ только при переносе электронов на двух последующих участках с более высоким потенциалом. Сложная структура комплекса II (сукцинатдегидрогеназы), вероятно, нужна только для обеспечения восстановления убихинона и не имеет отношения к фосфорилирующей способности мембраны.

12.5.1. Выход энергии в цикле лимонной кислоты

Действие цикла лимонной кислоты включает три стадии, в которых образуется NADH : изоцитрат $\rightarrow$ α -кетоглутарат, α -кетоглутарат $\rightarrow$ сукцинил- CoA и малат $\rightarrow$ оксалоацетат. Каждая из этих стадий обеспечивает возможность для образования трех молекул АТФ. Дополнительная молекула АТФ образуется в результате расщепления сукцинил- CoA (разд. 12.2.2). Окисление молекулы сукцината до фумарата флавопротеидом, а не пиридиннуклеотидзависимым ферментом приводит к образованию двух, а не трех молекул АТФ. Выход АТФ на отдельных стадиях цикла лимонной кислоты суммирован в табл. 12.3. На 1 моль потребленного ацетил- CoA используется 12 моль P_i и образуется 12 моль АТФ. Принимая для синтеза АТФ из ADP и P_i в физиологических условиях ΔG приблизительно равной $+12\,500$ кал/моль, получаем, что суммарный выход энергии в форме синтезированного АТФ выражается как $\sim 150\,000$ кал/моль в расчете на использованный ацетат. Этот вы-

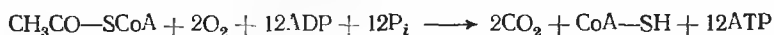
Таблица 12.3
Энергетический выход цикла лимонной кислоты

Реакция	Кофермент	Выход АТФ на 1 моль ацетил-СоА
Изоцитрат $\rightarrow$ α -кетоглутарат + CO_2	NAD	3
α -Кетоглутарат $\rightarrow$ сукцинил-СоА + CO_2	NAD	3
Сукцинил-СоА + ADP + $\text{P}_i \rightarrow$ сукцинат + АТФ	GDP	1
Сукцинат $\rightarrow$ фумарат	FAD	2
Малат $\rightarrow$ оксалоацетат	NAD	3
Всего		12

ход энергии можно сравнить с суммарным выходом энергии при окислении уксусной кислоты до CO_2 и H_2O :



для которого $\Delta G^\circ = 209\,000$ кал/моль. Окисление ацетил-СоА в цикле лимонной кислоты, сопряженное с фосфорилированием, может быть представлено следующим образом:



Теперь можно оценить суммарный выход АТФ в результате окислительных процессов в митохондриях, протекающих с восстановлением трех молекул O_2 шестью парами электронов, которые получают из одной молекулы триозы, происходящей из одной половины молекулы глюкозы. Малатный челнок обеспечивает образование одной молекулы NADH на одну молекулу триозы; в результате действия пируватдегидрогеназы образуется еще одна молекула NADH. Окисление каждого из этих NADH приводит к синтезу трех молекул АТФ. Как отмечалось ранее, один оборот цикла лимонной кислоты дает 12 молекул АТФ на одну молекулу ацетил-СоА. Суммарный выход, таким образом, составляет 18 молекул АТФ на одну молекулу триозы или 36 АТФ на молекулу глюкозы.

12.5.2. Тканевое дыхание

Потребление кислорода (объем газа в микролитрах при стандартном давлении и температуре) на миллиграмм ткани обозначается как Q_{O_2} . В животных тканях Q_{O_2} подвержена значительным колебаниям (табл. 12.4). Ввиду того что дыхательный процесс во

Таблица 12.4
Дыхание различных тканей и митохондрий

Ткань	$Q_{O_2}^a$	Ткань	$Q_{O_2}^a$
Митохондрии летательной мускулатуры	500	Слизистая оболочка двенадцатиперстной кишки	9
Митохондрии сердца	80	Легкие	8
Сетчатка	31	Плацинта	7
Почки	21	Миелоидный костный мозг	6
Печень голодающих животных	17	Тимус	6
Печень накормленных животных	12	Поджелудочная железа	6
Слизистая оболочка тонкой кишки	15	Диафрагма	6
Щитовидная железа	13	Сердце в состоянии покоя	5
Семенники	12	Слизистая оболочка подвздошной кишки	5
Кора головного мозга	12	Лимфатический узел	4
Гипофиз	12	Скелетная мышца в состоянии покоя	3
Селезенка	12	Роговица	2
Надпочечник	10	Кожа	0,8
Красный костный мозг	9	Хрусталик глаза	0,5

$^a Q_{O_2}$ — количество потребленного O_2 (в микролитрах на миллиграмм сухой массы в час). Все значения, кроме первых двух, для срезов тканей крысы в растворе рингера-фосфат+глюкоза.

Во всех тканях происходит с участием цитохромной цепи и сопряжен с потреблением фосфата, можно принять, что скорость дыхания каждой отдельной ткани определяется ее потребностью в АТФ. Реакции окисления, катализируемые аэробными дегидрогеназами и медьсодержащими оксидазами, оксигеназами и пероксидазами, не сопряжены со связыванием фосфата. Поэтому скорость, с которой могут протекать эти частные окислительные процессы, зависит только от обычных факторов, влияющих на ферментативную активность. Если какое-то вещество, окисление которого катализируется таким образом, вводится интактному животному или в инкубационную среду с препаратом ткани, можно ожидать, что окисление этого вещества будет проходить без каких-либо затруднений, тем самым увеличивая скорость потребления кислорода. Напротив, введение вещества, окисление которого обязательно сопряжено с фосфорилированием, например кормление пищей, содержащей избыток углеводов, не стимулирует дыхание. Избыточные калории

запасаются в тканях в виде гликогена или липида до тех пор, пока потребность в АТФ не вызовет окисления этих резервных источников энергии.

12.5.3. Дыхательный контроль

Свежеприготовленные митохондрии, достаточно снабженные O_2 и субстратом, дышат только в присутствии ADP и P_i . Потребление кислорода и синтез АТФ протекают тогда параллельно, и поддерживается постоянное отношение P/O. При описании этих митохондрий говорится, что они прочно сопряжены и находятся под дыхательным контролем. Эта характеристика митохондрий иллюстрируется данными табл. 12.5.

Таблица 12.5

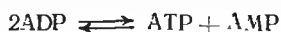
Окислительно-восстановительные уровни компонентов дыхательной цепи в различных метаболических условиях^a

Состояние	Уровень субстрата	Уровень O_2	Уровень ADP	Скорость дыхания	Фактор, лимитирующий скорость	Степень восстановления в стационарном состоянии, %				
						NAD	флавин	цитохромы		
								b	c	a
1 Низкий	+	Низкий	Медленная	ADP	50	21	17	7	0	0
2 0	+	Высокий	Медленная	Субстрат	0	0	0	0	0	0
3 Высокий	+	Высокий	Быстрая	Дыхательная цепь	53	20	16	6	4	4
4 Высокий	+	Низкий	Медленная	ADP	99	40	35	14	0	0
5 Высокий	0	Высокий	0	O_2	100	100	100	100	100	100

^a Взято с изменениями из работы [Chance B., Williams G. R., Adv. Enzymol., 17, 65, 1956].

Прочное сопряжение дыхания с фосфорилированием в нормальных митохондриях создает условия, при которых скорость окисления питательных веществ регулируется потребностями клетки в полезной энергии. В результате использования АТФ для осуществления разнообразных нуждающихся в энергии клеточных процессов автоматически возрастают количества доступных ADP и P_i , которые в свою очередь получают возможность реагировать в сопряженном механизме и позволяют совершаться процессу дыхания.

Аденилаткиназа — это широко распространенный фермент, катализирующий реакцию



Этот фермент может служить в качестве средства для максимального использования энергии АТР в том случае, когда АТР расходуется быстрее, чем синтезируется. При течении реакции в обратном направлении осуществляется первая стадия в синтезе АТР из АМР. Последний образуется во многих синтетических процессах, например при активации жирных кислот и аминокислот (гл. 17 и 26). АМР, а не АДФ играет роль положительного или отрицательного модулятора, контролирующего скорости нескольких ферментативных процессов, например через фосфофруктокиназную, дифосфофруктозофосфатазную, гликогенфосфорилазную и изоцитратдегидрогеназную реакции (гл. 14 и 15), давая сигнал о необходимости синтеза АТР и ускоряя приток субстрата к циклу лимонной кислоты и прохождение через него.

12.5.4. Другие формы преобразования энергии в митохондриях

В то время, когда исследователи искали пути к пониманию окислительного фосфорилирования, им стало ясно, что митохондрии участвуют в нескольких типах преобразования энергии. Каждое из них представляет собой определенный вариант основного процесса сопряжения. Любая гипотеза, объясняющая окислительное фосфорилирование, также должна давать объяснения и этим явлениям. Некоторые из процессов такого рода рассмотрены в общем случае ниже.

Обратный поток электронов. Хотя при E'_0 для пары сукцинат/фумарат не может осуществляться восстановление NAD^+ сукцинатом, такой процесс происходит в митохондриях при анаэробных условиях, если в систему вносится извне АТР. Это свидетельствует о возможности физического использования энергии гидролиза АТР для того, чтобы дать возможность электронам восстановленного убихинона восстанавливать NAD^+ при $\Delta E'_0 \approx 300$ мВ.

Трансгидрогеназная реакция. Отношение NAD/NADP в клетке варьирует в широких пределах — от наименьшего в печени до наибольшего в скелетной мышце. NADP отсутствует в митохондриях мышц, в то время как митохондрии печени содержат в 3 раза больше NADP , чем NAD , причем большая часть NADP сконцентрирована в наружной мембране и в межмембранном пространстве. Особенно поразительно, что, хотя E'_0 для систем NAD^+/NADH и $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ по существу равны, в стационарном состоянии живого организма большая часть NAD находится в окисленной форме, в то время как основная масса NADP восстановлена. Этот факт отражает различную роль этих коферментов в метаболизме. NADH в основном генерируется митохондриальными дегидрогена-

зами и вновь окисляется электронпереносящей системой; NADPH образуется с помощью цитоплазматических дегидрогеназ, а также митохондриальных трансгидрогеназ из NADH (см. ниже) и используется для восстановительных биосинтезов во всех частях клетки. NADPH не может прямо окисляться митохондриальной системой, аналогичной той, которая действует в случае NADH. Эти два кофермента могут существовать в некотором равновесии друг к другу, которое устанавливается под действием любого фермента, одинаково легко использующего оба кофермента. Имеется несколько таких цитоплазматических ферментов (разд. 13.1), и такое равновесное состояние действительно имеет место. Интересно, каким же образом восстановительная способность дегидрогеназ цикла лимонной кислоты, которые образуют NADH, используется для восстановления NADP⁺.

В митохондриях печени и сердца осуществляется трансгидрогеназная реакция, которую можно записать следующим образом:



Процесс протекает только в одном направлении, т. е. равновесие, как видно из написанного, так сильно сдвинуто вправо, что обратный процесс почти невозможно измерить. Трансгидрогеназную реакцию удастся продемонстрировать в дышащих митохондриях при фактическом отсутствии АТФ, а также в анаэробных условиях, когда используется 1 экв. АТФ на 1 моль пиридиннуклеотидов. Соответственно и энергия АТФ, и энергия процесса переноса электрона могут утилизироваться для поддержания далекого от равновесия состояния систем NAD/NADP. Трансгидрогеназная реакция катализируется специфическим ферментом во внутренней мембране. Интересно, что атом водорода переносится от А-стороны никотинамидного кольца NADH на В-сторону кольца NADP⁺, что свидетельствует о наложении плоскости колец этих пиридиннуклеотидов на поверхность фермента. Стереоспецифичность дегидрогеназ рассматривается в разд. 13.1.

Транслокация ионов. Матрикс свежевыделенных митохондрий приблизительно изотоничен в отношении [K⁺]. При помещении митохондрии в гипотоническую среду или при более быстром воздействии вызывающих *набухание агентов*, например при обработке мылами, K⁺ вытекает из внутреннего пространства митохондрии, но может снова накапливаться там во время дыхания. Этот процесс проявляется особенно отчетливо в присутствии валиномицина. K⁺ или обменивается почти в эквивалентном отношении на внутримитохондриальный H⁺, или же необходимая для поступления K⁺ энергия поставляется в виде внешней АТФ. Отношение транслоцированного K⁺ к использованному ~Р составляет около трех. Более того, может быть продемонстрирована и обратная ситуация. Если

митохондрии предварительно обработаны так, что $[K^+]$ в матриксе превышает $[K^+]$ в среде, выход K^+ из митохондрии в среду может служить движущей силой для образования АТФ из АДФ и P_i . В последнем случае среда защелачивается, поскольку протоны поступают в митохондрию (в первом варианте среда закисляется, а матрикс защелачивается).

Удивительно также свойство митохондрий концентрировать Ca^{2+} или Sr^{2+} из среды. В среде, богатой Ca^{2+} , накопление может осуществляться при отношении $Ca^{2+}/O \approx 4$. Если анионом в омывающей среде является Cl^- , Ca^{2+} обменивается на H^+ , и матрикс защелачивается. Если анионом в среде является P_i , он следует за Ca^{2+} через мембрану. Концентрирование проходит настолько эффективно, что гранулы гидроксиапатита (гл. 39) могут выпадать в осадок в матриксе. Как и транспорт K^+ , этот процесс может идти за счет энергии дыхания или экстрамитохондриальной АТФ.

12.5.5. Механизм окислительного фосфорилирования

Многие различающиеся по химическим свойствам реагенты разобщают фосфорилирование и митохондриальный транспорт электронов, который в таком случае протекает с максимальной скоростью, но не сопровождается образованием АТФ. Необычная природа такого процесса становится еще более очевидной из поведения дыхательных частиц мембраны таких бактерий, как *Alcaligenes faecalis*. Эти частицы не обнаруживают никакого дыхательного контроля. Скорость дыхания полностью диктуется наличием окисляемого субстрата, и процесс идет с одинаковой скоростью как в присутствии, так и в отсутствие $ADP + P_i$, несмотря на то что если два последние компонента добавлены, то происходит образование АТФ. Подобные примеры наблюдаются у многих микроорганизмов, ни у одного из которых не было обнаружено отношение $P/O > 2$. Напротив, дыхание митохондрий животного или растения осуществляется с максимальной скоростью только в том случае, когда сопрягающий механизм нарушен и синтез АТФ ослаблен или полностью прекращен. В течение четверти века в теориях, касающихся механизма окислительного фосфорилирования, доминировала точка зрения, согласно которой в процессе переноса электронов по электронпереносящей цепи должны возникнуть высокоэнергетические соединения, используемые затем для синтеза АТФ, подобно тому как это происходит при гликолизе (гл. 14). Но такие промежуточные продукты не были обнаружены; возможно, что они вообще не существуют.

Вместе с тем все более мощные экспериментальные доказательства свидетельствуют в пользу иной концепции, принципиально уже получившей общее признание и известной под названием *химииосмотической* или *протондвижущей гипотезы*. Основное положение

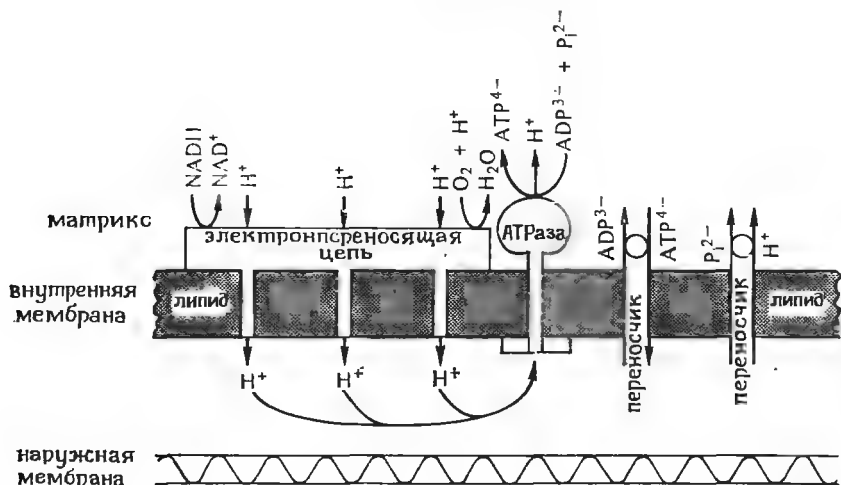
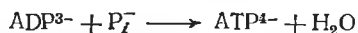


Рис. 12.18. Общая схема окислительного фосфорилирования посредством протон-движущего механизма.

этой концепции состоит в том, что при соответствующей физической организации компонентов внутренней митохондриальной мембраны клетки используют движение протонов в направлении электрохимического градиента (вниз по градиенту) для того, чтобы совершать такую работу, как синтез АТФ или передвижение других растворенных веществ против их концентрационных градиентов без образования ковалентно связанных с окислительно-восстановительными парами мембраны промежуточных высокоэнергетических соединений. Для осуществления окислительного фосфорилирования в системе должны происходить процессы, схематически показанные на рис. 12.18.

Полагают, что белки переносящей электроны цепи расположены в мембране таким образом, чтобы система работала в каком-то одном направлении (векторно); это означает, что в качестве неотъемлемой части процесса восстановления и последующего окисления последовательных электронных переносчиков протоны без сопровождающих анионов выталкиваются с наружной стороны мембраны, т. е. в межмембранное пространство. В результате может произойти как понижение рН в жидкости межмембранного пространства, так и возникновение электрического потенциала $\Delta\psi$ на мембране; причем внутренняя сторона ее заряжается отрицательно. Возвращение протонов в обратном направлении через мембрану осуществляется через тот мембранный белок, к которому присоединен F_1 — АТФ-синтетаза (обратимая АТРаза) с активным центром на внутренней матриксной стороне. Направление и силу

этому потоку протонов придают как отрицательный заряд на внутренней, матричной стороне мембраны, так и разность концентраций протонов (ΔpH) на обеих сторонах мембраны. Именно этот поток протонов — двигательная сила реакции

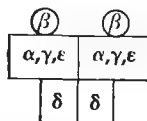


Сведения об источнике протонов менее определены. Одна гипотеза утверждает, что выделяемые с наружной стороны мембраны протоны — это именно те специфические протоны, которые генерируются при окислении определенных компонентов электронпереносящей цепи, т. е. при окислении $NADH$, FMN и CoQ . Тогда выход этих протонов должен представлять собой специфически направленный процесс, направление которого определяется физической организацией мембранных компонентов. Каждая из вышеуказанных окислительно-восстановительных пар мембраны, восстанавливаясь, должна принимать протоны из матрикса, подобно тому как она принимает электроны от своего специфического восстановителя. Другой теоретически допускаемой возможностью является векторно организованный процесс, соответствующий эффекту Бора для гемоглобина (гл. 31). Различные переносчики электронов в восстановленном состоянии могут отдавать один или больше протонов, освобождая их с наружной стороны мембраны, и снова захватывать протоны из матрикса при новом окислении благодаря изменению конформации и констант диссоциации соответствующих групп. Механизм такого типа необходим для завершающей части процесса, так как протоны не вовлекаются в перенос электронов между цитохромами c_1 , c и цитохромоксидазой, а также потому, что при окислении последней кислородом действительно потребляются протоны. Возможно, оба механизма являются действующими.

Хотя и существует неясность в отношении действительного механизма выделения протонов, его реальное существование не вызывает сомнений. Процесс легко демонстрируется в опытах с интактными митохондриями, фрагментами митохондрий или субмитохондриальными частицами. На основании измерений ранее предполагалось, что на электронную пару на каждом «участке» фосфорилирования, т. е. для каждого комплекса I, III и IV, имеет место выход $2H^+$. Более поздние данные свидетельствуют о возможности иной стехиометрии, а именно $4H^+$ на электронную пару на каждом участке. Этого достаточно для синтеза АТФ и титрования P_i при его транспорте в матрикс. Пройдя через АТФазу и вернувшись в матрикс, протоны завершают свой кругооборот. Движение протонов от высокого протонного потенциала к низкому аналогично электрическому току, и поэтому уместно, говоря о нем, употреблять термин «протонный ток».

12.5.5.1. Митохондриальная АТРаза

Основным компонентом элементарных частиц, выступающих на поверхности внутренней мембраны, является комплекс V, или Ca^{2+} - Mg^{2+} -зависимая АТРаза, первоначально названная сопрягающим фактором F_1 , участие которого требуется для синтеза АТР. Этот холодолабильный комплекс с молекулярной массой 340 000 содержит пять типов полипептидных цепей (от каждого по две), обозначаемых как α , β , γ , δ и ϵ , с молекулярными массами 56 000, 52 000, 32 000, 21 000 и 11 500 соответственно. На основании поведения фермента при диссоциации предполагается следующее расположение субъединиц:



Ни одна из отдельных субъединиц не обнаруживает АТРазную активность, но эту активность можно наблюдать при комбинации субъединиц α и β . Изолированный фермент содержит две прочно связанные молекулы ADP на молекулу фермента. Они могут быть удалены с помощью нескольких процедур, включая кратковременную обработку трипсином; процедуры не затрагивают гидролитической активности АТРаза, но вызывают утрату АТРСинтетазной активности. Отсюда следует, что та форма F_1 , которая содержит связанный ADP, и есть активная форма фермента в мембране. Судя по нескольким критериям, этот белок претерпевает значительное конформационное изменение при активации мембраны потоком электронов.

Мембрана митохондрий также содержит F_0 — гидрофобную субструктуру, состоящую по крайней мере из четырех полипептидных цепей. Полученный из аналогичной по функции мембраны *E. coli* F_0 относится к числу самых неполярных белков, известных в настоящее время; он не содержит триптофана, цистенна, серина и гистидина, но обогащен метионином, глицином, лейцином и аланином. Встраивание F_0 в липиды мембраны объясняется его гидрофобной природой. Считается, что F_1 специфически прикреплен к F_0 δ -цепями. Удаление F_1 из мембраны делает F_0 «проницаемым» для внешних протонов. Просачивание протонов, по-видимому, происходит по «каналу», имеющемуся в F_0 ; этот канал может быть «запечатан» либо путем повторной добавки F_1 , либо под действием дциклогексилкарбодимида (ДЦКД, разд. 12.5.1), который ковалентно реагирует с F_0 . Очевидно, простирающийся через толщу мембраны F_0 и представляет собой тот канал, через который протоны переходят к активному центру АТРСинтетазы. Вполне возможно, что эффективная $[\text{H}^+]$ в этом протонном канале может

быть значительно выше, чем в растворе на любой стороне мембраны, создавая на активном центре микросреду, которая управляет образованием АТФ. Детальный механизм, посредством которого осуществляется это управление, неизвестен. Результаты наблюдений дают основание предполагать, что фермент действует по типу «перескока» («флип-флоп») с использованием двух площадок связывания субстрата. АТФ связана с одной из них, а вторая связывает ADP и P_i . Изменение ферментного белка, индуцированное по крайней мере двумя протонами на молекулу, вызывает одновременное образование АТФ на одной площадке и высвобождение АТФ на другой и т. д. Не ясно, является ли это изменение только конформационным или также включает образование промежуточного фермент-фосфатного комплекса.

Уверенность в правильности протондвижущей гипотезы основана большей частью на результатах опытов с модельными системами. С этой целью можно приготовить пузырьки из митохондриальных фосфолипидов или из фосфолипидов соевых бобов, в которые встроены F_1 или $F_1 + F_0$, а также, например, цитохромоксидаза, цитохром *c* и его восстановитель, такой, как аскорбиновая кислота. Препараты такого типа выделяют протоны при окислении субстрата и в присутствии ADP и P_i участвуют в синтезе АТФ, тогда как в обычном растворе этих белков и субстратов АТФ не может образовываться.

Вывернутые субмитохондриальные частицы (разд. 12.3.1) при окислении сукцината или NADH выделяют протоны в свое внутреннее пространство. Если смоделированные пузырьки приготовлены таким образом, чтобы ориентация их мембраны соответствовала ориентации мембраны вывернутых субмитохондриальных частиц с АТФазой на наружной поверхности, то тогда внутри таких пузырьков происходит закисление, как, например, при встраивании функционирующего комплекса III, это сопровождается синтезом АТФ на наружной поверхности. Особенно впечатляющим оказался результат встраивания в смоделированные пузырьки полученного из пурпурной мембраны бактерии *Halobacterium halobium* бактериородопсина — соединения сходного с родопсином сетчатки (гл. 40). При освещении эта структура «перекачивает» протоны из среды внутрь пузырька. Когда включали в пузырьки АТФазу митохондрий печени таким образом, чтобы сферические головки были на наружной стороне пузырьков, при освещении наблюдался синтез АТФ.

В описанных выше модельных системах с вывернутыми пузырьками, а также в хлоропластах при процессе фотосинтеза (гл. 16) трансмембранный градиент кислотности ΔpH — основная движущая сила синтеза АТФ. Но в митохондриях *in situ* и в дышащих бактериях (см. ниже) наблюдаемый ΔpH , составляющий лишь немногим больше 1, слишком мал, чтобы отвечать за синтез АТФ.

Как отмечалось ранее, при обычных физиологических условиях для синтеза АТР требуется $\Delta E \approx 250$ мВ. При переводе ΔpH в электрические единицы, получаем

$$\Delta E = \frac{-2,3RT}{F} \Delta pH = -60 \Delta pH \text{ (мВ) при } 30^\circ\text{C}$$

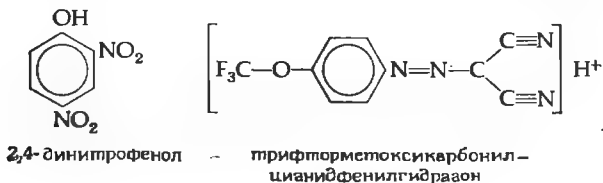
Таким образом, если $\Delta pH \approx 1$, то трансмембранный потенциал составляет лишь 60 мВ, что недостаточно для осуществления синтеза АТР, даже если $[ADP]$ и $[P_i]$ были бы очень высокими, а $[ATP]$ очень низкой. Однако в работающей митохондрии разность электрических потенциалов поперек мембраны $\Delta\Psi$ близка к 175 мВ. Суммарный эффективный электрохимический потенциал выражается просто как

$$\bar{\Delta\mu_{H^+}} = \Delta\Psi - 60 \Delta pH \text{ (мВ)}$$

Измерения показали, что электрохимический потенциал в митохондриях и бактериальных мембранах $\bar{\Delta\mu_{H^+}}$ составляет от 230 до 250 мВ, т. е. достаточен для осуществления синтеза АТР. При использовании специальных методик можно получить из липидов соевых бобов или из фосфатидилэтаноламина или фосфатидилсерина (но не из фосфатидилхолина) плоские мембраны, в которых соответствующим образом ориентирована цитохромоксидаза; в таких мембранах выброс протонов происходит только на той стороне, на которой расположен цитохром *c*, и $\Delta\Psi$ может быть прямо измерено подходящими электродами. У таких «грубых» препаратов обнаруживали $\Delta\Psi \approx 200$ мВ. Подобные наблюдения сделаны и с встроенным в плоскую мембрану бактериородопсином при освещении.

12.5.5.2. Разобщители

Механизм действия многих классических разобщителей окислительного фосфорилирования может быть объяснен с позиций протон-движущей гипотезы. В присутствии разобщителей синтез АТР не происходит, тогда как скорость окисления субстрата и потребления кислорода максимальны. Примеры таких соединений — 2,4-динитрофенол и *n*-трифторметоксикарбонилцианидфенилгидразон:

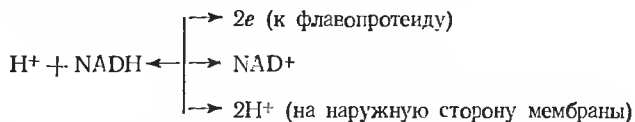


Эти соединения представляют собой липофильные слабые кислоты, которые могут мигрировать через липидную фазу мембраны как в ионизированной, так и в неионизированной форме. При этом они замыкают протонный ток, переправляя протоны непосредственно через липидную фазу мембраны.

Существуют также истинные ингибиторы окислительного фосфорилирования, из числа которых особенно примечательны ДЦКД и антибиотик олигомицин. Как отмечалось ранее (разд. 12.5.1), ДЦКД реагирует с F_0 , блокируя перемещение протонов через мембрану. Олигомицин каким-то подобным образом реагирует с «ножкой», связывающей F_1 с мембраной, так что становится невозможным как синтез АТФ, так и перемещение протонов. Торможение потока протонов сопровождается таким сдвигом равновесия реакций между протонсекретирующими компонентами электронпереносящей цепи, в условиях которого вообще не могут осуществляться ни синтез АТФ, ни движение потока электронов (дыхание).

12.5.5.3. Обратимость

Ранее отмечалось, что в митохондриях при анаэробии и наличии АТФ может происходить восстановление NAD^+ сукцинатом. Это становится возможным благодаря обратимости действия АТФазы. Генерируемые при гидролизе матричной АТФ протоны продвигаются через F_0 обратно в межмембранное пространство, причем создается $[H^+]$ в межмембранной жидкости. Это явление было изучено в опытах с обычными вывернутыми пузырьками, когда оказалось, что направление потока H^+ через мембрану с той стороны, где идет гидролиз АТФ, определяется расположением АТФазы в каждом из двух изученных препаратов. Если представить упрощенно, что $NADH$ -дегидрогеназа (комплекс I) катализирует реакцию



то сукцинатдегидрогеназа должна отдавать $2e^-$ в электронпереносящую цепь ($E'_0 = +30$ мВ), в то время как АТФаза развивает сильное локальное давление протонов на мембране. Поскольку NAD^+ действительно восстанавливается, протонное давление, возникающее при гидролизе АТФ в таких экспериментальных условиях, должно иметь величину почти 300 мВ.

Это обстоятельство прекрасно раскрывает природу того «сцепления», которое сопрягает окисление с фосфорилированием. Дыхание не может осуществляться, если не имеются в наличии АДФ

и P_i , которые, комбинируясь, дают АТФ. Если АТФ в матриксе имеется в избытке, а АДФ и P_i недоступны, обратимая АТРаза обеспечивает максимальное протонное давление в межмембранном пространстве. Окислительный процесс в этом случае не может протекать, так как окислительно-восстановительный цикл каждого из работающих комплексов обязательно сопровождается также и «секрецией» протонов. Если последняя становится невозможной из-за уже существующей высокой $[H^+]$, созданной АТРазой активностью, перенос электронов также невозможен. Таким образом, механизм сцепления в действительности заключается в установлении определенного протонного давления на наружной стороне внутренней мембраны.

Еще один компонент мембраны — *NADP-NAD-трансгидрогеназа*; она напоминает АТРазу в том отношении, что состоит из крупного водорастворимого белка, связанного с белковым комплексом, который является интегральной частью мембраны. Эта трансгидрогеназа катализирует митохондриальную реакцию



Можно предположить, что процесс также совершается с участием механизма, который использует как восстановительную силу $NADH$, так и $\Delta\mu_{H^+}$.

В работающей митохондрии $\Delta\mu_{H^+}$ генерируется механизмами переноса электронов от $NADH$ к O_2 . В экспериментальных условиях $\Delta\mu_{H^+}$ может создаваться добавкой АТФ к митохондриям в отсутствие окисляемого субстрата. Таким образом, митохондрия способна к преобразованию различных форм химического потенциала; в этой системе ΔE , ΔpH , $\Delta\psi$, $\Delta\mu_{H^+}$ и $\sim P$ эквивалентны и взаимозаменяемы.

Справедливость представлений о $\Delta\psi$ и ΔpH иллюстрируется также поведением митохондрий и субмитохондриальных частиц при добавке ионофоров. Добавка валиномицина в суспензию дышащих митохондрий в содержащей K^+ среде вызывает вход K^+ , который переносится валиномицином. В результате уменьшается $\Delta\psi$, но не меняется ΔpH . Дальнейший выход H^+ частично восстанавливает $\Delta\mu_{H^+}$, и матрикс становится более щелочным. Антибиотик нигерицин, представляющий собой полиэфир с одной свободной карбоксильной группой выступает в роли антипереносчика пары K^+/H^+ . Поэтому он может уменьшать ΔpH , но не $\Delta\psi$ на мембране. Таким образом, ни нигерицин, ни валиномицин поодиночке не разобщают фосфорилирование и не оказывают заметного влияния на $\Delta\mu_{H^+}$ дышащих вывернутых субмитохондриальных частиц, выделяющих в свое внутреннее пространство протоны. Однако при комбинации этих двух соединений нигерицин обменивает внут-

рений H^+ на внешний K^+ , который затем выходит с валиномицином; так что в конечном итоге снимаются как ΔpH , так и $\Delta\psi$ и прекращается синтез АТФ.

12.5.5.4. Активный транспорт в бактериальных клетках

Роль $\Delta\psi$, ΔpH и ΔE в синтезе АТФ также отмечали при наблюдении дышащих плазматических мембран бактериальных клеток. Дыхательные ферменты *E. coli* локализованы в липидной мембране; при окислении такого субстрата, как α -лактат, протоны выбрасываются наружу, генерируются ΔpH и $\Delta\psi$ и поддерживается внутриклеточная [АТФ]. В этом состоянии клеточная мембрана может участвовать в активном транспорте лактозы из среды. Этот транспорт внутрь осуществляется по типу симпорта, в котором вход галактозида сопровождает вход H^+ или K^+ . В таких мембранных пузырьках синтез АТФ может индуцироваться потоком H^+ внутрь или потоком K^+ наружу и зависит от $\Delta\mu_{H^+}$, превышающей 200 мВ, но не зависит от того, чей вклад, ΔpH или $\Delta\psi$, больше в создании $\Delta\mu_{H^+}$.

Хотя в рамках химосмотической гипотезы, по-видимому, получает рациональное объяснение и связывается воедино большое число наблюдений, несколько важных вопросов остаются нерешенными. Например, часто экспериментально находят, что $\Delta\mu_{H^+} \leq \leq 200$ мВ, тогда как для синтеза АТФ в физиологических условиях требуется > 250 мВ. Требуют разъяснения механизм и стехиометрия секреции протонов. Эффекты известных соединений-разобщителей не объясняются только их относительной липофильностью и не находятся в прямом соответствии с их константами диссоциации слабых кислот. Механизм действия АТФ-синтетазы неизвестен; неясно также, каким образом процессы, происходящие в ее активном центре, управляются $\Delta\mu_{H^+}$. Обмен кислорода $H_2^{18}O$ с P_i , катализируемый этим ферментом, не получил еще адекватного объяснения. Вместе с тем очень многие экспериментальные наблюдения принципиально вполне укладываются в рамки этого красивого единого объяснения; это оправдывает его признание в настоящее время.

12.5.6. Митохондрии бурого жира

Всем позвоночным в молодом возрасте для образования тепла, в дополнение к механизму мышечного тремора, необходимо термогенное устройство. Такого рода устройство особенно важно для животных, впадающих в зимнюю спячку. Мышцы в состоянии тремора сокращаются при отсутствии нагрузки, используя сократительные белки для гидролиза АТФ обычным для мышечных клеток

образом и освобождая в виде тепла всю энергию, потенциально доступную при гидролизе АТР. Необходимость особого термогенного устройства определяется прочно сопряженным окислительным фосфорилированием нормальных митохондрий. Если бы этот процесс мог быть разобщен, как это бывает в присутствии динитрофенола, он мог бы служить в качестве адекватного приспособления, производящего тепло; именно так это и происходит в митохондриях бурого жира. Хотя эти митохондрии обладают обычной обратимой АТРАЗой, в них имеется также трансмембранная протонная транслоказа, посредством которой протоны могут возвращаться в матрикс и электрически шунтировать работу АТРАЗы. Представляется вероятным, что в действительности носитель транспортирует гидроксидные ионы из матрикса в межмембранное пространство; при этом, однако, достигается тот же результат. Если этот процесс достаточен для того, чтобы поддерживать $\Delta\mu_{H^+}$ значительно ниже 200 мВ, синтез АТР становится невозможным и окислительный процесс протекает свободно, в результате чего вся энергия освобождается в виде тепла.

12.5.7. Эволюционное происхождение митохондрий

Органелла, приспособленная для использования атмосферного кислорода при окислении различных субстратов с последующим синтезом АТР, не могла бы возникнуть до тех пор, пока кислород не появился в первичной восстановительной атмосфере благодаря деятельности фотосинтезирующих организмов. Результаты многочисленных наблюдений дают основания предполагать, что митохондрия в ее настоящем виде образовалась в результате успешного симбиоза эукариотной клетки, имевшей хорошо развитый гликолитический (анаэробный) путь метаболизма, и (не имевшей ядра) прокариотной клетки, которая обладала мембранной дыхательной цепью переноса электронов. Даже современные митохондрии располагают своим собственным генетическим аппаратом (ДНК, рибосомы) и обладают способностью изготавливать белки, основываясь на информации своей собственной ДНК (гл. 26). Однако лишь часть всех митохондриальных белков, а именно около дюжины полипептидных цепей, производится этим аппаратом, включая, например, три из пяти полипептидных цепей цитохромоксидазы, одну или две цепи цитохрома *b*, одну или две цепи АТРАЗы, которые являются интегральной частью мембраны. Представляется вероятным, что в митохондриях синтезируются необычно гидрофобные водонерастворимые белки, которые иначе бы подверглись самоагрегации. Таким образом удастся избежать необходимости их передвижения на какое-либо расстояние через цитозоль. Инструкции по синтезу многих других полипептидных цепей заложены, как обычно, в хромосомах клеточного ядра.

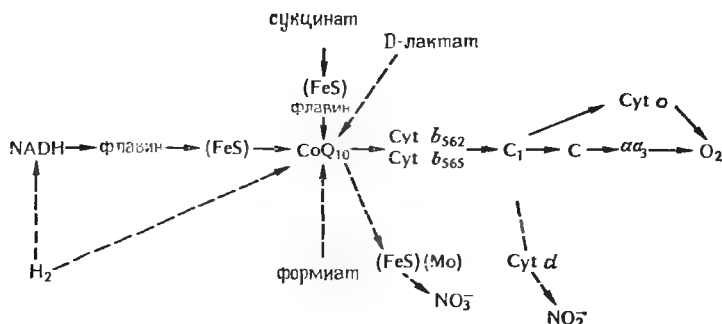


Рис. 12.19. Электронпереносная цепь *P. denitrificans*. Сплошные стрелки обозначают конститутивные ферменты. Штриховые стрелки обозначают адаптивные ферменты, образующиеся только в соответствующих условиях.

Интересный эволюционный маркер представляет собой супероксид — дисмутаза (разд. 10.2.3); аминокислотная последовательность этого фермента из митохондрий печени, имеющего в своем составе Mn^{2+} , более напоминает прокариотический белок *E. coli*, чем цитоплазматический фермент из той же ткани, содержащий Cu^{2+} и Zn^{2+} . Существующая в настоящее время прокариота, которая может напоминать предка митохондрий, — это *Paracoccus denitrificans*. Организация дыхательной цепи в клеточной мембране этого организма, показанная на рис. 12.19, очень похожа на митохондриальную и функционирует с жестким дыхательным контролем и $P/O=3$. Эти клетки развили адаптивные приспособления для использования своих дыхательных цепей с иными, чем у митохондрии, субстратами, но основная конститутивная цепь и связанная с ней способность фосфорилирования вполне могли служить в качестве эволюционного предшественника митохондрии (гл. 27).

Литература

Книги

- Azzone G. F., Klingenberg M. E., Quagliariello E., Siliprandi N., eds., Membrane Proteins in Transport and Phosphorylation, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1974.
- Broda E., The Evolution of Bioenergetic Processes, Pergamon Press, Oxford, 1975.
- Bücher T., Sies H., eds., Inhibitors: Tools in Cell Research, Springer-Verlag. OHG, Heidelberg, 1969.
- Ciba Foundation Symposia, Energy Transformation in Biological Systems, Associated Scientific Publishing, Amsterdam, 1975.
- Ernster L., Estabrook R. W., Slater E. C., eds., Dynamics of Energy-transducing Membranes, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1974.
- Goodwin T. W., ed., Metabolic Roles of Citrate, Academic Press, Inc., New York, 1968.

- Green D. E.*, ed., *The Mechanism of Energy Transduction in Biological Systems*, Ann. N. Y. Acad. Sci., **227**, 1—680, 1974.
- Haddock B. A., Hamilton W. A.*, eds., *Microbial Energetics*, Cambridge University Press, Cambridge, 1977.
- Halefi Y., Djavadi-Ohanian L.*, eds., *The Structural Basis of Membrane Function*, Academic Press, Inc., New York, 1976.
- Kroon A. M., Saccone C.*, eds., *The Biogenesis of Mitochondria*, Academic Press, Inc., New York, 1974.
- Lloyd D.*, *The Mitochondria of Microorganisms*, Academic Press, Inc., New York, 1974.
- Lovenberg W.*, ed., *Iron-Sulfur Proteins*, Academic Press, Inc., New York, 1974.
- Mehlman M. A., Hanson R. W.*, eds., *Energy Metabolism and the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria*, Academic Press, Inc., New York, 1972.
- Mitchell P.*, *Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction*, Glynn Research, Ltd., Bodmin, England, 1968.
- Munn E. A.*, *The Structure of Mitochondria*, Academic Press, Inc., New York, 1974.
- Packer L.*, ed., *Biomembranes: Architecture, Biogenesis, Bioenergetics and Differentiation*, Academic Press, Inc., New York, 1974.
- Parsons D. S.*, ed., *Biological Membranes*, Oxford University Press, London, 1975.
- Racker E.*, *A New Look at Mechanisms in Bioenergetics*, Academic Press, Inc., New York, 1976.
- San Pietro A., Gest H.*, eds., *Horizons of Bioenergetics*, Academic Press, Inc., New York, 1972.
- Schultz J., Cameron B. F.*, eds., *The Molecular Basis of Electron Transport*, Academic Press, Inc., New York, 1972.
- Slater E. C., Kaniuga Z., Wojtczak L.*, eds., *Biochemistry of Mitochondria*, Academic Press, Inc., New York, 1972.
- Tedeschi H.*, *Mitochondria: Structure, Biogenesis and Transducing Functions*, Springer-Verlag, New York, 1976.
- Wainio W. W.*, *The Mammalian Mitochondrial Respiratory Chain*, Academic Press, Inc., New York, 1970.
- Weissman G., Claiborne R.*, eds., *Cell Membranes: Biochemistry, Cell Biology and Pathology*, HP Publishing Co., New York, 1975.

Обзорные статьи

- Ackrell B. A. C.*, *Metabolic Regulatory Functions of Oxaloacetate*, *Horizons Biochem.*, **1**, 175—219, 1974.
- Ashwell M., Work T. S.*, *The Biogenesis of Mitochondria*, *Annu. Rev. Biochem.*, **39**, 251—290, 1970.
- Baltscheffsky H., Baltscheffsky M.*, *Electron Transport Phosphorylation*, *Annu. Rev. Biochem.*, **43**, 871—898, 1974.
- Boos W.*, *Bacterial Transport*, *Annu. Rev. Biochem.*, **43**, 123—146, 1974.
- Boyer P. D., Chance B., Ernster L., Mitchell P., Racker E., Slater E. C.*, *Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation*, *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 955—1026, 1977.
- Chance B.*, *The Nature of Electron Transfer and Energy-coupling Reactions*, *FEBS Lett.*, **23**, 3—20, 1972.
- Flatmark T., Pedersen J. I.*, *Brown Adipose Tissue Mitochondria*, *Biochem. Biophys. Acta*, **416**, 53—104, 1975.
- Fonyo A., Palmieri F., Quagliariello E.*, *Carrier-mediated Transport of Metabolites in Mitochondria*, *Horizons Biochem.*, **2**, 60—105, 1975.
- Green D. E., MacLennan D. H.*, *The Mitochondrial System of Enzymes*, pp. 47—111, in: *D. M. Greenberg, ed., Chemical Pathways in Metabolism*, 3d ed., vol. I, Academic Press, Inc., New York, 1967.

- Hamilton W. A.*, Energy Coupling in Microbial Transport, *Adv. Microb. Physiol.*, **12**, 3—55, 1975.
- Harold F. M., Attendorf K. H.*, Cation Transport in Bacteria, *Curr. Top. Membranes Transp.*, **5**, 1—50, 1974.
- Himms-Hagen J.*, Cellular Thermogenesis, *Annu. Rev. Physiol.*, **38**, 315—351, 1976.
- Klingenberg M.*, The ATP-ADP Carrier in Mitochondrial Membranes, in: A. N. Martinosi, ed., *The Enzymes of Biological Membranes*, Plenum Press, New York, 1976.
- Lipmann F.*, Metabolic Generation and Utilization of Phosphate Bond Energy, *Adv. Enzymol.*, **1**, 99—162, 1941.
- Lowenstein J. M.*, The Tricarboxylic Acid Cycle, pp. 146—270, in: D. M. Greenberg, ed., *Chemical Pathways of Metabolism*, 3d ed., vol. I, Academic Press, Inc., New York, 1967.
- Mitchell P.*, Translocations through Natural Membranes, *Adv. Enzymol.*, **29**, 33—87, 1967.
- Mitchell P.*, Vectorial Chemistry and the Molecular Mechanics of Chemiosmotic Coupling: Power Transmission by Proticity, *Trans. Biochem. Soc.*, **4**, 399—430, 1976.
- Panet R., Sanadi D. R.*, ATPases of Mitochondria, Chloroplasts and Bacteria, *Curr. Top. Membranes Transp.*, **8**, 99—160, 1976.
- Papa S.*, Proton Translocation Reactions in the Respiratory Chain, *Biochem. Biophys. Acta*, **456**, 39—84, 1976.
- Pressman B. C.*, Biological Applications of Ionophores, *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 501—530, 1976.
- Radda G. K.*, The Design and Use of Fluorescent Probes for Membrane Studies, *Curr. Top. Bioenerg.*, **4**, 81—126, 1971.
- Salton M. R. J.*, Membrane Associated Enzymes in Bacteria, *Adv. Microb. Physiol.*, **11**, 213—283, 1974.
- Singer S. J.*, The Molecular Organization of Membranes, *Annu. Rev. Biochem.*, **43**, 805—834, 1974.
- Singer T. P., Gutman M.*, The DPNH Dehydrogenase of the Mitochondrial Respiratory Chain, *Adv. Enzymol.*, **34**, 79—154, 1971.
- Simoni R. D., Postma P. W.*, The Energetics of Bacterial Transport, *Annu. Rev. Biochem.*, **44**, 523—554, 1975.
- Skulachev V. P.*, Energy Transformations in the Respiratory Chain, *Curr. Top. Bioenerg.*, **4**, 127—190, 1971.
- Skulachev V. P.*, Transmembrane Electrochemical H^+ -potential as a Convertible Energy Source for the Living Cell, *FEBS Lett.*, **74**, 1—9, 1977.
- Smoly J. M., Kuylenstierna B., Ernster L.*, Topological and Functional Organization of the Mitochondrion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **66**, 125—131, 1970.
- Srere P. A.*, The Enzymology of the Formation and Breakdown of Citrate, *Adv. Enzymol.*, **43**, 57—102, 1975.
- Van Dam K., Meyer J. A.*, Oxidation and Energy Conservation by Mitochondria, *Annu. Rev. Biochem.*, **40**, 115—160, 1971.
- Vignais P. V.*, Molecular and Physiological Aspects of Adenine Nucleotide Transport in Mitochondria, *Biochem. Biophys. Acta*, **456**, 1—38, 1976.

Глава 13

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ. II

Окислительные ферменты, коферменты и переносчики

Те сотни специфических ферментов, которые катализируют окислительные реакции, действуют благодаря наличию специальных приспособлений к относительно небольшому числу функциональных групп. Химическая природа этих групп и формы их участия в окислительных процессах позволяют сделать четыре достаточно информативных обобщения:

1. Для того чтобы сохранить восстановительные эквиваленты различных субстратов в соответствии с основными задачами клетки, эти восстановительные эквиваленты чаще всего передаются никотинамиднуклеотиду (NAD^+ или NADP^+) посредством дегидрогеназ, некоторые из которых также содержат связанный ион металла, например Zn^{2+} .
2. Некоторые субстраты восстанавливают связанный со специфической дегидрогеназой флавиннуклеотид, который в свою очередь посылает электроны прямо к переносчикам, тесно связанным с внутренней митохондриальной мембраной.
3. Цитоплазматические ферменты, окисляющие субстраты и непосредственно восстанавливающие O_2 , обычно используют в качестве простетической группы или флавиннуклеотид, или металл, например Cu^{2+} или Fe^{3+} .
4. В число многообразных комплексов, которые могут комбинироваться различными способами для функционирования в окислительно-восстановительных системах, входят флавиннуклеотиды; дисульфиды; железо, медь, молибден и другие металлы; железосерокомплексы и железопорфириновые соединения. Связанные в различных комбинациях эти компоненты делают возможным формирование электронпереносящих цепей различной длины и сложности.

13.1. Никотинамидадениндинуклеотиды

Никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+ , разд. 12.1.1) обнаружен Харденом и Йонгом при исследовании ими брожения, вызываемого дрожжами. Никотинамидадениндинуклеотидфосфат

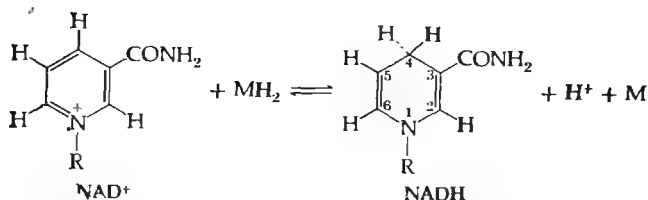
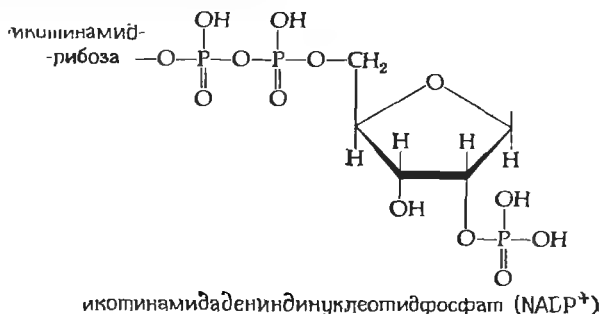


Рис. 13.1. Стереоспецифичное восстановление никотинамидадениндинуклеотида (NAD).

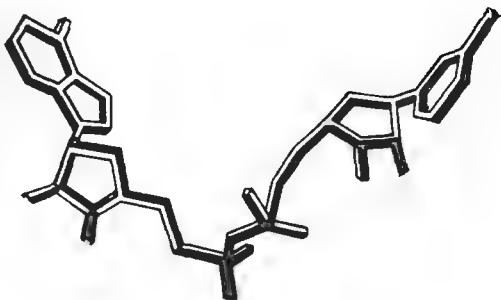
(NADP⁺) идентифицирован Варбургом и Христианом как кофермент идущего в эритроцитах окисления глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконолактон (разд. 14.8). Хотя эти соединения принято называть динуклеотидами, на самом деле входящие в состав их молекул два мононуклеотида связаны пирофосфатной связью в отличие от динуклеотидов нуклеиновых кислот, где между мононуклеотидами имеется фосфодиэфирная связь. NADP⁺ содержит третью молекулу фосфата, образующего сложноэфирную связь с С-2' рибозного остатка аденозиновой части NAD⁺. Биогенез и превращения пиридиннуклеотидов рассмотрены в гл. 24 и 50.

Сокращенные формулы на рис. 13.1 показывают, что, когда NAD⁺ или NADP⁺ восстанавливаются путем двухэлектронного переноса в ферментативной реакции, они принимают гидрид-ион H⁻ от окисляемого субстрата, в то время как протон переходит в среду. Восстановленное хиноидное соединение не имеет заряда на азоте пиридинового кольца и содержит один водород, полученный от субстрата. Поэтому восстановленный NAD⁺ сокращенно обозначается NADH. Вновь введенный водород фиксируется в пиридиновом кольце в положении 4:



Поскольку пиридиновое кольцо NADH — плоская структура, два атома водорода у атома С-4 располагаются по обе стороны плоскости кольца. Стереоспецифичность образования и последую-

Рис. 13.2. Растянутая конформация NAD при связывании с дегидрогеназой. (Взято с некоторыми упрощениями из работы [Banaszak L. J., Bradshaw R. A., p. 384, in P. D. Boyer, ed. The Enzymes, vol. XI. 3d ed., Academic Press, Inc., New York, 1975].)



щего окисления NADH доказана следующим образом: NAD²H получали неферментативным путем при восстановлении NAD⁺ дитионитом в ²H₂O (дейтерированная вода); полученный таким путем NAD²H использовали для восстановления ацетальдегида в реакции, идущей с участием алкогольдегидрогеназы. Оказалось, что образующиеся в ходе этой реакции этанол и NAD⁺ содержали каждый 1/2 г-экв. дейтерия на 1 моль. Однако, если NAD⁺ восстанавливали синтетическим CH₃C²H₂OH в присутствии дрожжевой алкогольдегидрогеназы, образовывался NAD²H, содержащий один атом дейтерия на молекулу. При инкубации этого NAD²H с ацетальдегидом и алкогольдегидрогеназой или с пируватом и лактатдегидрогеназой дейтерий количественно переносился с образованием соответственно дейтерированного этанола или дейтерированного лактата. Таким образом, перенос атомов водорода этими дегидрогеназами стереоспецифичен в отношении плоскости пиридинового кольца. Очевидно также, что алкогольдегидрогеназа проявляет стереоспецифичность к двум атомам водорода на несущем гидроксидную группу атоме углерода этанола. Дрожжевая алкогольдегидрогеназа и лактатдегидрогеназа сердца характеризуются одинаковой стереоспецифичностью: они катализируют перенос водорода к одной и той же стороне пиридинового кольца (4-pro-R) и от нее. Эти соединения называются дегидрогеназами А-типа. Как показано в табл. 13.1, другие ферменты, относящиеся к В-типу, осуществляют стереоспецифичный перенос к противоположной стороне пиридинового кольца (4-pro-S) и от нее. Атом водорода, присоединяемый дегидрогеназами А-типа, обращен в сторону читателя от плоскости пиридинового кольца, если это кольцо ориентировано, как показано на рис. 13.1.

Кристаллографические исследования дегидрогеназ показали, что связанные с ними пиридиннуклеотидные субстраты находятся скорее в растянутой конфигурации, как это показано на рис. 13.2, чем в более компактной конфигурации, свойственной свободной форме этих соединений в растворе.

Таблица 13.1

Стереоспецифичность некоторых никотинамиднуклеотидных ферментов

Субстрат	Нуклеотид	Источник	Стереоспецифичность
Изоцитрат	NADP	Сердце	A
Этанол	NAD	Дрожжи	A
Лактат	NAD	Сердце	A
Малат	NAD	»	A
NADP+	NAD	Митохондрии сердца	A
Фарнезилпирофосфат	NADP	Печень	B
Галактоза	NAD	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	B
Глюкоза	NAD	Печень	B
Глюкозо-6-фосфат	NADP	Дрожжи	B
Глутамат	NADP, NAD	Печень	B
Глутатион	NADP	Дрожжи	B
3 α -Оксистероиды	NAD	Печень	B
3 β -Оксистероиды	NAD	<i>Pseudomonas</i>	B
17 β -Оксистероиды	NAD, NADP	Печень	B
6-Фосфоглюконат	NADP	»	B
3-Фосфоглицеральдегид	NAD	Дрожжи, мышцы	B
NADP+	NAD	<i>Pseudomonas</i> , <i>E. coli</i>	B

Таким образом, стереоспецифичность переноса водорода определяется тем, к какой стороне плоскости никотинамидного кольца обращен связанный с ферментом субстрат.

Никотинамиднуклеотиды служат в качестве коферментов для более 250 различных дегидрогеназ, некоторые из которых перечислены в табл. 13.2. Между химическими свойствами субстрата и избирательностью фермента по отношению к NADP⁺ или NAD⁺ не наблюдается взаимосвязи. Многие дегидрогеназы обнаруживают активность только с одним из этих нуклеотидов, несколько дегидрогеназ с почти равной скоростью катализируют реакцию с любым нуклеотидом, но большинство дегидрогеназ проявляет каталитическую активность с одним коферментом, причем скорость таких реакций во много раз превышает скорость реакций с другим нуклеотидом. Поведение фермента по отношению к коферменту может меняться в зависимости от источника, из которого этот фермент получен. Так, митохондриальные глутаматдегидрогеназы печени могут использовать как NAD⁺, так и NADP⁺. Когда дрожжи или клетки *Neurospora* выращиваются в среде, содержащей глу-

Таблица 13.2
**Некоторые дегидрогеназы, использующие пиридиннуклеотиды
 в качестве коферментов**

Субстрат	Продукты	Кофермент	Источник
Ациклические поли- спирты	Кстозы	NAD	Печень крысы, <i>Aero- bacter</i>
Альдегиды	Карбоновые кислоты	NAD	Печень
β -Полуальдегид аспа- рагиновой кислоты	β -Аспартилфосфат	NAD	Печень
Бетаннальдегид	Бетанин	NAD	Печень крысы
Этанол	Ацетальдегид	NAD	Печень, дрожжи, почки
D-Глицерат	Оксипируват	NAD	Печень
α -Глицерофосфат	Диоксиацетонфосфат	NAD	Дрожжи, мышца, пе- чень
L-Гулонат	Ксилулоза + CO ₂	NAD	Почки
ω -Оксикислоты	ω -Альдегидокислоты	NAD	Печень
D (—)- β -Оксибутират	Ацетоацетат	NAD	Печень
L (—)- β -Оксибути- рил-CoA	Ацетоацетил-CoA	NAD	Печень
3 β -Оксистероиды	3-Кетостероиды	NAD	<i>Pseudomonas</i>
17 β -Оксистероиды	17-Кетостероиды	NAD	»
Инозинат	Ксантилат	NAD	<i>E. coli</i> <i>Aerobacter aerogenes</i>
Изоцитрат	α -Кетоглутарат + CO ₂	NAD	Митохондрии сердца быка, печени крысы и дрожжевые
Изоцитрат	α -Кетоглутарат + CO ₂	NADP	Цитозоль сердца
Лактат	Пируват	NAD	Мышца, другие жи- вотные ткани
Малат	Оксалоацетат	NAD	То же
Малат	Пируват + CO ₂	NADP	Цитозоль печени го- лубя
Полуальдегид малено- вой кислоты	Малонат	NAD	<i>Pseudomonas</i>
D-Маннит	D-Фруктоза	NAD	<i>Acetobacter</i>
Глицеральдегид-3- фосфат	1,3-Дифосфоглицерат	NAD	Все животные ткани, дрожжи, бактерии
Рибит	Рибулоза	NAD	Печень
Полуальдегид янтар- ной кислоты	Сукцинат	NAD	Мозг, бактерии

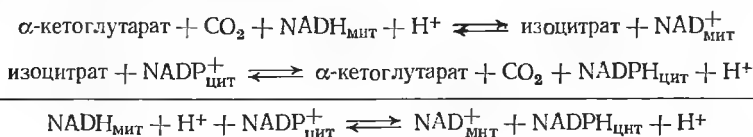
Продолжение табл. 13.2

Субстрат	Продукты	Кофермент	Источник
Полуальдегид тар- троновой кислоты	Глицерат	NAD	<i>Pseudomonas</i>
Глицерин	Диоксиацетон	NAD или NADP	Печень свиньи, кры- сы, <i>E. coli</i>
Глутамат	α -Кетоглутарат + +NH ₄ ⁺	NAD или NADP	Мышца, печень
3 β -Оксистероиды	3-Кетостероиды	NAD или NADP	Печень
Дигидрофолат	Тетрагидрофолат	NADP	»
D-Фруктоза	5-Кето- D-фруктоза	NADP	<i>Glucanobacter cirinus</i>
Глюкозо-6-фосфат	6-Фосфоглюконат	NADP	Печень, эритроциты, дрожжи
L-Гулонат	D-Глюкуронат	NADP	Почки
Изоцитрат	α -Кетоглутарат+CO ₂	NADP	Различные животные ткани, дрожжи
Малат	Пируват+CO ₂	NADP	Сердце
Восстановленный глу- татион (GSH)	Глутатион (G—SS—G)	NADP	Дрожжи, печень
Шикимат	Дегидрошикимат	NADP	Фасоль, <i>E. coli</i>

тамат, их глутаматдегидрогеназы специфичны к NAD⁺; если же в среде отсутствует эта аминокислота, продуцируется NADP⁺-зависимый фермент. Опять-таки глюкозо-6-фосфат — дегидрогеназа дрожжей абсолютно специфична к NADP⁺, в то время как этот же фермент из печени млекопитающих использует NAD⁺ со скоростью, составляющей ~7% скорости использования NADP⁺ при эквивалентных концентрациях этих коферментов. Такое различие в специфичности к NAD⁺ и NADP⁺ позволяет клетке поддерживать NAD⁺ главным образом в окисленном, а NADP⁺ — в почти полностью восстановленном состоянии в соответствии с их функциями. В тканях животных концентрация NAD⁺ варьирует от 0,5 до 3,0 ммоль/л, тогда как концентрация NADP⁺ — от 0,01 до 0,1 ммоль/л; только в печени концентрация NADP⁺ составляет 1/3 концентрации NAD⁺. Эти концентрации имеют тот же порядок, что и K_m реакций с участием указанных веществ, когда они выполняют роль катализаторов. В общем случае ферменты, ответственные за окислительные процессы, снабжающие энергией организм, нуждаются в NAD⁺, тогда как ферменты, катализирующие реакции восстановительных синтезов, используют NADPH. Единство глав-

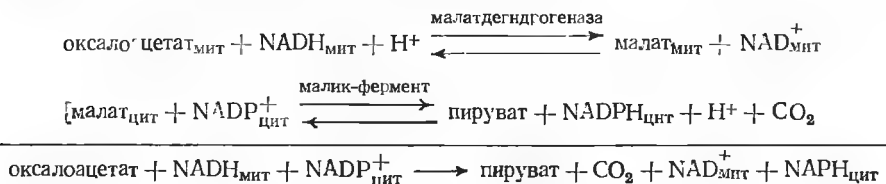
ных путей метаболизма в организмах различных видов находит свое отражение в почти универсальном распространении тех многочисленных NAD^+ - или NADP^+ -зависимых дегидрогеназ, которые имеются в живых формах.

Когда специфичный к NAD^+ фермент присутствует в одном клеточном отсеке, а специфичный к NADP^+ фермент — в другом, челночное движение субстрата туда и обратно через мембрану может служить в качестве механизма переноса восстановительных эквивалентов. Например, две изоцитратдегидрогеназы (табл. 13.2) — NAD^+ -зависимая в митохондриях (индекс „мит”) и NADP^+ -зависимая в цитозоле (индекс „цит”) — могут функционировать следующим образом:



Таким образом, способный к диффузии изоцитрат переносит водород через митохондриальную мембрану, между NAD^+ и NADP^+ .

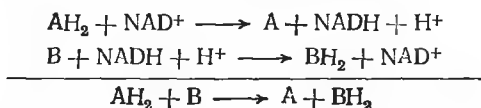
«Водород» могут также переносить другие пары ферментов, имеющие общий субстрат. Малатдегидрогеназа и малик-фермент катализируют следующую пару реакций:



В этом случае малат пересекает митохондриальную мембрану, перенося водород митохондриального NADH к NADP^+ цитозоля. Такой перенос водорода через митохондриальную мембрану является важным аспектом превращения углеводов пищи в резервные жирные кислоты (гл. 17).

Термины *простетическая группа* и *кофермент* не совсем подходят для обозначения никотинамиднуклеотидов. Значения K_m для NAD^+ и NADP^+ варьируют от 100 до 1 мкмоль/л, что лишь незначительно ниже K_m для «субстратов» этих ферментов (1—0,01 ммоль/л). В общем случае NADH связывается с большинством дегидрогеназ в 10—100 раз прочнее, чем NAD^+ . Никотинамиднуклеотиды легко диссоциируют от дегидрогеназ и, по существу, представляют собой косубстраты, коферментная функция которых

заключается лишь в том, что в физиологических условиях восстановленные формы окисляются *другими* ферментами, катализирующими этот процесс; в результате создаются условия для повторного использования нуклеотидов, так что они могут циклически функционировать в каталитических количествах. Кроме того, благодаря такой легкости диссоциации никотинамиднуклеотиды, единственные среди окислительных коферментов, могут принимать участие в дисмутациях, т. е. в восстановлении одного метаболита другим:

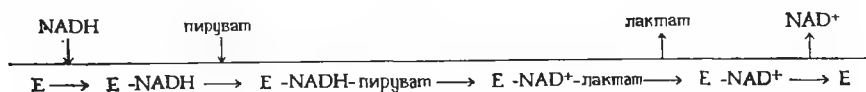


Для подобного сопряжения требуется челночное перемещение NAD^+ между поверхностями двух субстратспецифичных дегидрогеназ. В качестве наиболее показательных примеров такого процесса можно привести участие NAD^+ в гликолизе (разд. 14.4) и восстановительный синтез жирных кислот с использованием NADPH , который генерируется при окислении углевода (разд. 14.8). Интересная возможность открывается при сопряжении пары дегидрогеназ, относящихся соответственно к А- и В-типу. Например, представляется вероятным, что в процессе гликолиза NADH , восстановленный на поверхности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, может быть использован для восстановления пирувата лактатдегидрогеназой без отделения от первого фермента. Примечательна в этом отношении *лактат-малат — трансгидрогеназа* из *Micrococcus lactilyticus*, связывающая NAD^+ так прочно, что он может быть удален только посредством обработки 4 М мочевиной. NAD^+ остается прикрепленным к ферменту, который способен акцептировать лактат и оксалоацетат или пируват и малат на своих субстратсвязывающих центрах.

В противоположность своим окисленным формам NADH и NADPH сильно поглощают при 340 нм. Это свойство лежит в основе большей части аналитических методов наблюдения за ходом реакций, в которых участвуют эти коферменты. Кроме того, при активации светом при 340 нм оба кофермента обнаруживают флуоресценцию. Максимальное излучение наблюдается при ~ 465 нм. Связывание NADH или NADPH с апоферментом дегидрогеназы обычно сопровождается сдвигом максимума поглощения в более коротковолновую область (330—335 нм) и аналогичным сдвигом максимума флуоресценции до ~ 440 нм. В растворе изолированного кофермента большая доля флуоресцентного излучения от восстановленной никотинамидной части молекулы поглощается (гасится) соседним аденином, что объясняется сложной структурой молекулы динуклеотида. Растянутая структура связан-

ного с белком динуклеотида обуславливает значительную интенсификацию излучения (увеличение квантового выхода), вследствие чего измерение флуоресценции — особенно чувствительный метод для обнаружения комплекса между ферментом и коферментом. Связывание восстановленного никотинаминдинуклеотида с определенным флавопротенидом приводит к гашению флуоресценции рибофлавина посредством механизма, аналогичного действующему в растворах динуклеотида.

Кинетические данные, изучение комплексов с переносом заряда, исследования поляризации флуоресценции и использование аналогов как субстратов, так и коферментов подтверждают вывод о том, что центральный момент в действии этих дегидрогеназ — образование тройных комплексов, включающих фермент, субстрат и кофермент. В случае лактатдегидрогеназы, например, последовательные этапы процесса, очевидно, происходят благодаря следующему обязательному порядку связывания компонентов реакции:



Таким образом, пируват не может связываться с лактатдегидрогеназой до тех пор, пока не образован комплекс фермента с NADH, что свидетельствует об отсутствии пируватсвязывающего центра на поверхности фермента. Этот центр, вероятно, возникает в результате изменений конформации и/или заряда и т. д. вслед за образованием комплекса фермента с NADH. Сходными характеристиками обладают каталитические циклы многих дегидрогеназ, например алкогольдегидрогеназы печени. Иногда, например в случае глутаматдегидрогеназы, не существует обязательного порядка связывания; ни разу не удалось обнаружить, чтобы в обязательном порядке первым связывался субстрат, а не кофермент.

Характер связывающих центров для кофермента и субстрата на ферменте придает специфичность реакции. Эти связывающие центры находятся на специфических участках олигомерной формы фермента. Так, бычья глутаматдегидрогеназа (мол. масса 336 000) может диссоциировать на субъединицы (мол. масса 56 000), которые больше не обладают ферментативной активностью; однако агрегатам с мол. массой $\geq 336\,000$ уже свойственна активность. Сходным образом глицеральдегидфосфатдегидрогеназа мышцы (мол. масса 140 000) может диссоциировать на ферментативно инертные субъединицы. Связывание специфического кофермента, по-видимому, способствует как поддержанию конформации, так и сохранению специфической субъединичной структуры некоторых дегидрогеназ.

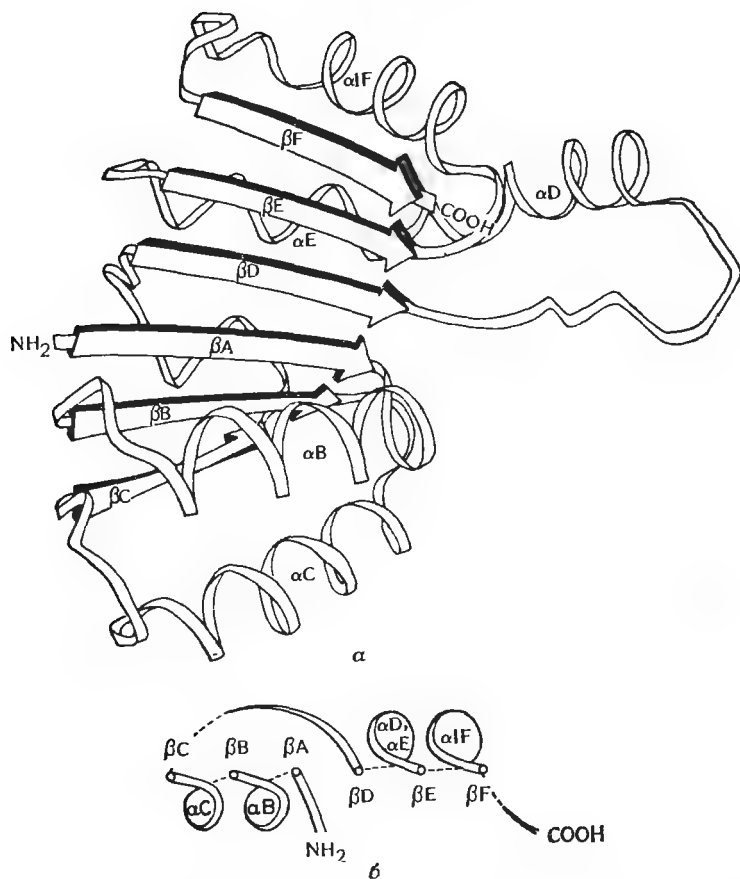


Рис. 13.3. Схематическое изображение NAD-связывающего участка в дегидрогеназах, рассматриваемых сверху, перпендикулярно многотяжевому складчатому слою. а — вид сверху; б — вид поперечного среза. [Rossmann M. G., Liljas A., Brändén C.-I., Banaszak L. J., p. 68, in: P. D. Boyer, ed., *The Enzymes*, vol. XI, 3d ed., Academic Press, Inc., New York, 1975.]

Молекулярные массы никотинамиднуклеотидзависимых дегидрогеназ варьируют в широком диапазоне. Большинство из них обнаруживает каталитическую активность только тогда, когда субъединицы объединены в димерной, тетрамерной или гексамерной форме, как, например, субъединицы малат-, лактат- и глутамат-дегидрогеназ. В большинстве случаев идентичные субъединицы самопроизвольно собираются в устойчивый, каталитически активный полимер. Иногда клетка образует более одного вида субъединиц, отличающихся разным числом аминокислотных замещений

В полипептидной цепи, которая у них в общем подобна. В этих условиях происходит гибридизация, приводящая к образованию изоферментов с различной субъединичной структурой. Первым хорошо изученным примером такого рода была лактатдегидрогеназа. Ткани млекопитающих продуцируют две электрофоретически различимые субъединицы α и β , так что образуются пять отчетливых изоферментов лактатдегидрогеназы: α_4 , $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_2\beta_2$, $\alpha_1\beta_3$ и β_4 . Они существенно различны по значениям K_m и V_{max} . Гибридизация может быть также достигнута *in vitro* с субъединицами из весьма отдаленных видов, например с лактатдегидрогеназами дрожжей и мышцы кролика. Присутствие NAD^+ во время смешения заметно ингибирует гибридизацию, в то время как $NADH$ ускоряет ее.

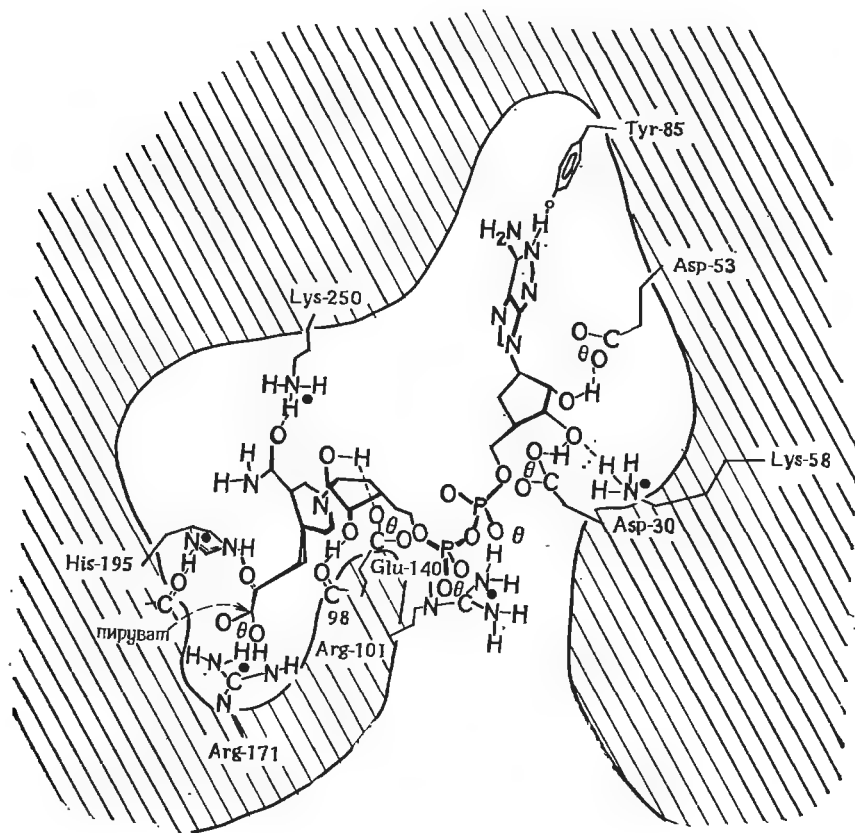
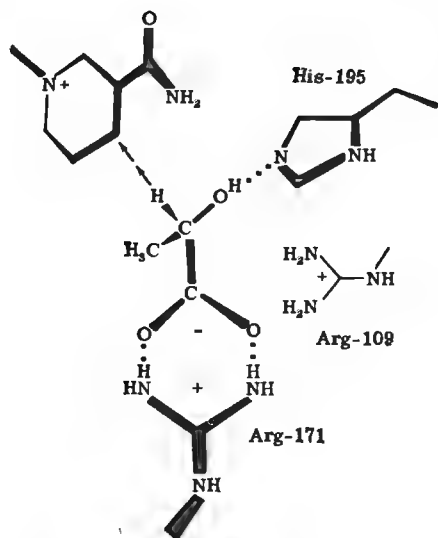


Рис. 13.4. Схематическое изображение связывания пирувата и NAD^+ с лактатдегидрогеназой. [Holbrook J. J., Liljas A., Steindel S. J., Rossmann M. G., p. 240, in: P. D. Boyer, ed., The Enzymes, vol. XI, Academic Press, Inc., New York, 1975.]

Рис. 13.5. Механизм действия лактат-дегидрогеназы. [Holbrook J. J., Liljas A., Steindal S. J., Rossmann M. G., p. 243, in: P. D. Boyer, ed., The Enzymes, vol. XI, Academic Press, Inc., New York, 1975.]



Очевидно, что в присутствии NAD^+ связь между тетрамерами упрочняется, в то время как NADH способствует ослаблению прочности структуры.

В печени присутствуют две различные субъединицы алкоголь-дегидрогеназы (E и S), дающие начало формам E_2 , ES и S_2 . Полученная из печени лошади форма E_2 имеет высокую активность по отношению к алифатическим спиртам с низкой молекулярной массой, тогда как форма S_2 эффективна в реакциях восстановления 3-кетостероидов и ретиналя до соответствующих 3- β -оксистероидов и ретинола; ES обладает промежуточными свойствами. Такая же картина наблюдается в случае фермента из печени человека, но в этом случае E_2 обладает небольшой стероид-дегидрогеназной активностью, а S_2 сохраняет активность с алифатическими спиртами.

Выяснена аминокислотная последовательность для нескольких дегидрогеназ и с помощью рентгеноструктурного анализа установлена трехмерная структура алкогольдегидрогеназы из печени лошади, глицеральдегидфосфатдегидрогеназы омара, цитоплазматической малатдегидрогеназы из сердца свиньи и лактатдегидрогеназы из акулы. Как показано на рис. 13.3, полипептидная цепь каждой из этих субъединиц в их нормальных полимерных формах образует структуру по типу складчатого слоя из шести нитей, где связывается аденилатная часть молекулы кофермента. На поверхности имеется щель, в которой многочисленные гидрофобные, электростатические взаимодействия и водородные связи удерживают на своих местах и кофермент, и субстрат.

На рис. 13.4 изображено связывание NAD^+ и пирувата в каталитическом центре субъединицы мышечной лактатдегидрогеназы. Каталитический центр не только обеспечивает сближение этих двух субстратов, но благодаря наличию специфических R-групп в аминокислотах облегчает реакцию (рис. 13.5).

Алкогольдегидрогеназа представляет собой особый фермент в том смысле, что каждая субъединица содержит два Zn^{2+} , один из которых физически стабилизирует третичную структуру фермента благодаря связям с лигандами — сульфгидрильными группами остатков цистеина в положениях 97, 100, 103 и 111, — а другой, участвующий в каталитическом цикле, связан с сульфгидрильными группами цистеиновых остатков в положениях 46 и 174 и с имидазольной группой гистидина-67; четвертое координационное положение этого атома заполнено молекулой воды или гидроксидным ионом. Присоединение NAD^+ к ферменту вызывает выброс протона в соответствии с механизмом, схема которого приведена на рис. 13.6. Цикл каталитической реакции показан на рис. 13.7.

По крайней мере в одной реакции — в окислении UDPглюкозы до UDPглюкуроновой кислоты — две молекулы NAD^+ последовательно используются для отнятия четырех электронов от субстрата без диссоциации промежуточного полуокисленного продукта. Реакция требует участия как аминокислоты, так и сульфгидрильной (тиоловой) группы фермента (рис. 13.8). Промежуточными продуктами являются шиффово основание альдегидного интермедиа-

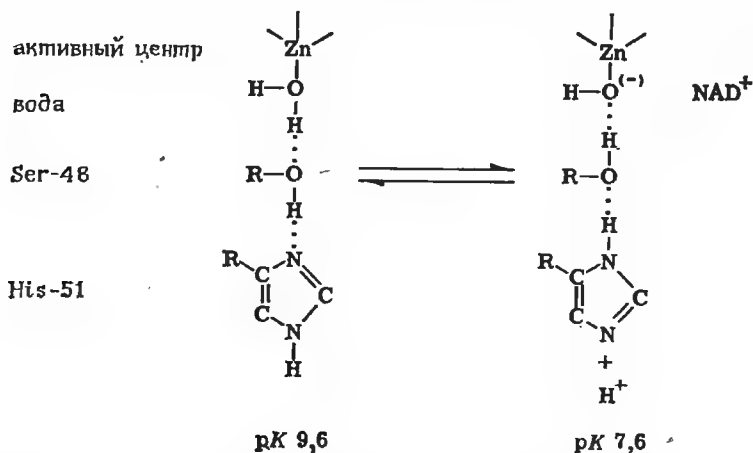


Рис. 13.6. Система водородных связей, образуемых связанной с Zn^{2+} молекулой воды, серином-48 и гистидином-51 алкогольдегидрогеназы печени; показан механизм освобождения протонов, вызываемого присоединением NAD^+ . [Brändén C.-I., Jörnvall H., Eklund H., Furugren B., p. 162, in: P. D. Boyer, ed., The Enzymes, vol. XI, 3d ed., Academic Press, Inc., New York, 1975.]

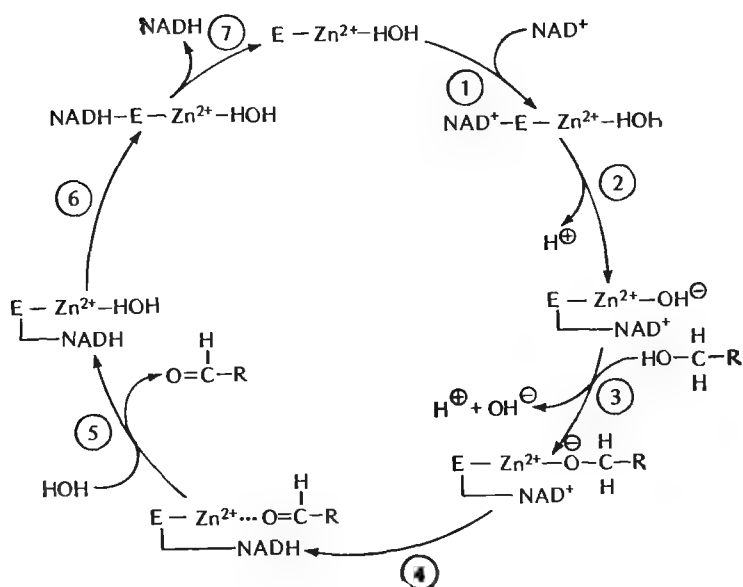


Рис. 13.7. Каталитический цикл алкогольдегидрогеназы печени (E — фермент).

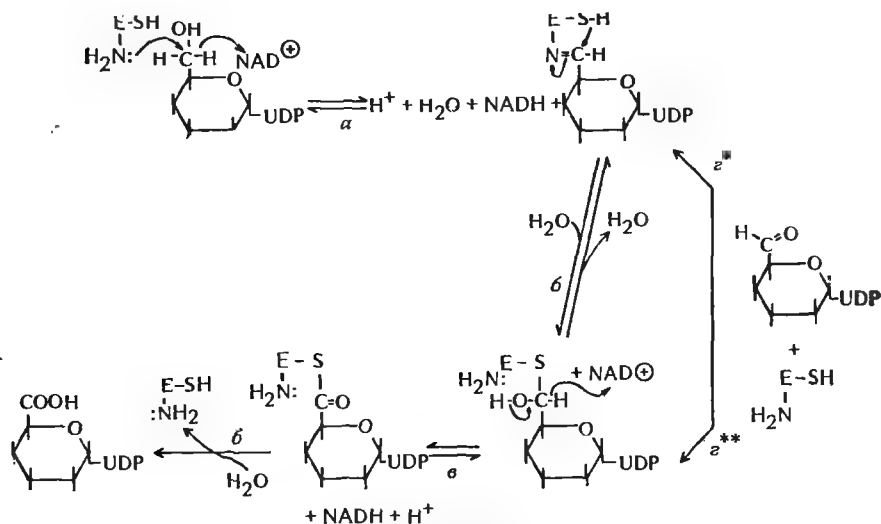


Рис. 13.8. Механизм действия UDP-глюкозодегидрогеназы (E — фермент). Обратите внимание, что образование шиффова основания и тиоэфира — неотъемлемые стадии окислительного процесса. [Ordman A. B., Kirkwood S., J. Biol. Chem., 252, 1324, 1977.]

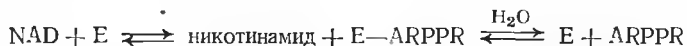
та и тиозфир кислоты, образующейся в результате суммарного процесса. Отметим, что оба этих промежуточных соединения образуются в окислительных реакциях.

13.1.1. Никотинамиднуклеотидтрансгидрогеназа

Некоторые бактерии, особенно *Pseudomonas aeruginosa*, содержат флавопротеид, катализирующий обратимый перенос водорода из положения 4-В NADPH в положение 4-В NAD⁺ с образованием NADH. Активный фермент представляет полимер, составленный из одной субъединицы (мол. масса 50 000), с которой связана одна молекула FAD. Кинетические свойства фермента отличаются сложностью, и механизм реакции неясен. Энергозависимая трансгидрогеназа внутренней мембраны митохондрий (разд. 12.5), которая катализирует перенос водорода из положения 4-А NADH в положение 4-В NADP⁺, исследовалась недостаточно очищенной, поэтому выяснить механизм ее действия не удалось.

13.1.2. Другие функции NAD⁺

NAD⁺ участвует в нескольких необычных реакциях, в которых не используются окислительно-восстановительные свойства этого кофермента. ДНК-лигаза из *E. coli*, катализирующая образование фосфодиэфирной связи между сшиваемыми 5'-фосфатным концом и 3'-гидроксидным концом двух полидезоксирибонуклеотидов, осуществляет эту реакцию дегидратации с участием комплекса аденилил-фермент; этот комплекс образуется наряду с никотинамидмононуклеотидом при расщеплении пирогосфатной связи NAD⁺ под действием ДНК-лигазы (гл. 25). Некоторые ферменты, очевидно, являются различными формами обычной NAD⁺нуклеозидазы (гл. 24), которая гидролизует N-рибозильную связь NAD⁺ с освобождением никотинамида и аденозилпирогосфорилрибозы (ARPPR):



Эта гидролитическая реакция ингибируется никотинамидом, механизм действия которого таков, что в присутствии больших концентраций никотинамида первая стадия реакции обращается. Для фермента из ядер клеток печени $K_i = 250$ мкмоль/л. Дифтерийный токсин сходным образом расщепляет NAD⁺, но переносит остаток ARPPR к необходимому для синтеза белка фактору-2 элонгации (EF-2), в результате чего весь процесс ингибируется (гл. 26). Клеточное ядро содержит еще одну NAD⁺нуклеозидазу, которая, однако, переносит ARPPR к рибозе второй молекулы ARPPR с образованием полиаденозиндифосфорилрибозы — полимера с неизвестной

функцией. Эта NADаза даже более легко ингибируется никотинамидом ($K_m^{\text{NAD}} = 250$ мкмоль/л, $K_i^{\text{никотинамид}} = 0,5$ мкмоль/л). Заметим, что урoканаза (гл. 23) из бактериальных источников содержит прочно связанный NAD^+ в качестве скорее структурного, чем функционального элемента.

13.2. Флавопротеиды

В 1932 г. Варбург и Христиан получили из дрожжей «желтый фермент», способный катализировать окисление NADPH. Вскоре после выяснения структуры рибофлавина было установлено, что простетическая группа этого фермента — рибофлавин-5'-фосфат (флавиномононуклеотид, FMN). Позднее было обнаружено, что коферментом почечной оксидазы D-аминокислот является флавинадениндинуклеотид (FAD) (разд. 12.1.1). Флавопротеиды распространены повсеместно. Способ присоединения флавинового нуклеотида к ферментам может быть различным; благодаря дополнительному связыванию одного или более ионов металла, железосерокомплекса или гема, возникает необычное разнообразие окислительно-восстановительных ферментов.

Связь флавиннуклеотидов с апобелками значительно прочнее, чем связь пиридиннуклеотидов с их дегидрогеназами. Константа равновесия для диссоциации комплекса белок-флавин $\rightleftharpoons$ белок + флавин обычно имеет порядок 10^{-8} — 10^{-9} , поэтому фактически флавиновый компонент остается постоянно связанным с апоферментом. В некоторых случаях ковалентная связь соединяет FAD с остатком полипептидной цепи белка, и поэтому после протеолиза FAD остается все еще связанным с определенной аминокислотой. В дегидрогеназе L-гулонолактона из печени и в бактериальных дегидрогеназах тиаминa эта связь находится между 8 α -положением рибофлавина флавиномононуклеотида FMN и N-1 гистидина белка. В сукцинатдегидрогеназе и оксидазе D-6-оксиникотина подобная связь имеется между FAD и гистидином. Цистеиновый остаток моноаминоксидазы из митохондрий печени присоединен в 8 α -положении рибофлавина тиюэфирной связью, в то время как между рибофлавином и цитохромом c_{552} образуется тиюполуацеталь. В большинстве других случаев флавиннуклеотид может быть отделен от белка при обработке высококонцентрированными солевыми растворами при pH 2—4.

Из табл. 13.3 следует, что флавопротеиды удивительно разнообразны (мол. масса 12 000 — 700 000). Они могут состоять из одной полипептидной цепи с одним флавиннуклеотидом или из нескольких субъединиц, с которыми связаны не только несколько флавиновых компонентов, но также один или более металлов, железосероцентров или гемов, что означает совмещение миниатюрной

Таблица 13.3
Некоторые флавопротеиды^a

Субстрат	Физиологи- ческий акцептор электронов	Флавин	Другие функциональ- ные компоненты	Источник
D-Аминокислоты	O ₂	FAD		Печень, почки
L-Аминокислоты	O ₂	FAD или FMN		Почки, змеиный яд
Моноамины	O ₂	FAD		Печень, почки, мозг
Диамины	O ₂	FAD		То же
Глюкоза	O ₂	FAD		Печень, плесневые грибы
α-Оксикислоты	O ₂	FMN		Почки
Ацил-СoA (C ₆ — C ₁₂)	ЭПФ	FAD		Митохондрии
Бутирил-СoA	ЭПФ	FAD		»
H ₂ (фотосинтез)	NADP-редук- таза	FMN		Анаэробы, сине-зе- леные водоросли
Дигидролипоат	NAD ⁺		Внутренний дисульфид	Митохондрии, <i>E. coli</i>
NADPH	Глутатион	FAD	Внутренний дисульфид	Печень, дрожжи, <i>E. coli</i>
NADPH	Тиоредоксин	FAD	Внутренний дисульфид	Печень, <i>E. coli</i>
NADH	H ₂ O ₂	FAD	Внутренний дисульфид	<i>Streptococcus fae- calis</i>
NADH	Цитохром b ₅	FAD		Микросомы печени
NADPH	Цитохром P ₄₅₀	FAD + FMN		Микросомы пече- ни, <i>Pseudomonas putida</i>
D-Лактат	Цитохром c	FAD	Zn ²⁺	Дрожжи
Ферредоксин	NADP ⁺	FAD		Хлоропласты
NADPH	Адренодок- син	FAD		Митохондрии ко- ры надпочечников
Дигидроорогат	NAD ⁺	FAD + FMN	(FeS) _n	<i>Zymobacterium oro- ticum</i>
NADH	Убихинон	FMN	(FeS) _n	Митохондрии
Сукцинат	»	FAD	(FeS) _n	»
Восстановленный ЭПФ	»	FAD	(FeS) _n	»
Холин	»	FAD	(FeS) _n	»

Продолжение табл. 13.3

Субстрат	Физиологический акцептор электронов	Флавин	Другие функциональные компоненты	Источник
α -Глицерофосфат	Убихинон	FAD	(FeS) _n	Митохондрии
Саркозин	»	FAD	(FeS) _n	»
Пурины	O ₂	FAD	Mo, (FeS) ₄	Молоко
Пурины	NAD ⁺	FAD	Mo, (FeS) ₄	Печень
Альдегиды	O ₂	FAD	Mo, (FeS) ₄	Печень
NADPH	NO ₂ ⁻	FAD	Сирогем	<i>Neurospora crassa</i>
NADPH	SO ₃ ⁻	FAD+FMN	(FeS) ₄ , сирогем	<i>E. coli</i>
L-Лактат	Цитохром c	FAD	Гем	Дрожжи

^a ЭПФ — электропереносящий флавопротеид; (FeS)_n — железосероцентр; о сирогеме см. разд. 13.5.2.

электронпереносящей системы на одном белке. Несколько примеров, иллюстрирующих разнообразие флавопротеидов, приведено в табл. 13.3.

Спектр поглощения флавопротеидов имеет максимумы ~280, 350—380 и 450 нм. Двухэлектронное восстановление флавина приводит к почти полному исчезновению полосы при 450 нм и частичному уменьшению поглощения при 280 и 380 нм. Три кольца рибофлавина в его окисленной форме расположены в одной плоскости. Восстановленная форма принимает конфигурацию крыла бабочки с осью перегиба между N-5 и N-10. Частичное восстановление флавопротеида до его семихинона может быть достигнуто путем титрования дитионитом или естественным субстратом в анаэробных условиях. Семихиноидная форма фермента, как правило, дает сигнал электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) при $g=2$, характерный для органических свободных радикалов. Отсутствие сигналов ЭПР у некоторых частично восстановленных форм флавопротеидов, несмотря на сходство спектральных характеристик таких форм с приведенными на рис. 13.9, позволяет предположить, что пара флавиновых семихинонов вступает в спин-спиновое взаимодействие. Различают два класса флавопротеидов: те, которые образуют при частичном восстановлении красный семихинон, и те, которые образуют синий семихинон (рис. 13.10). К первой группе относятся главным образом оксидазы; это означает, что полностью восстановленная форма окисляется O₂ с образованием H₂O₂. Вторая группа представлена дегидрогеназами; они взаимодействуют с O₂ гораздо медленнее по одноэлектронной реакции, которая идет

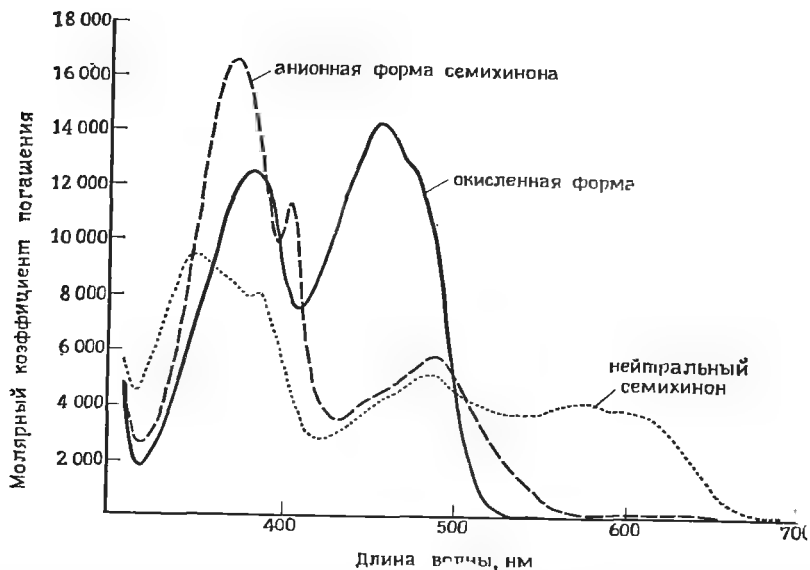


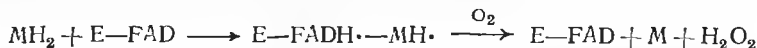
Рис. 13.9. Спектры поглощения двух форм флавинового семихинона в присутствии глюкозооксидазы. Красная анионная форма получена при освещении видимым светом в анаэробнозе в присутствии этилендиаминтетраацетата при pH 9,2. Синяя форма получена в результате снижения pH до 5,85. [Massey V., Mathews R. G., Font G. P., Howell L. G., Williams C. H., Jr., Zanetti G., Ronchi S., p. 384, in: H. Sund, ed., Pyridine Nucleotide Dehydrogenases, 5th ed., Springer-Verlag, New York, Inc., New York, 1970.]

с образованием устойчивого синего семихинона и аниона супероксида O_2^- .

Свободный рибофлавин обладает сильной флуоресценцией с максимумом ~ 500 нм. FMN флуоресцирует с такой же интенсивностью, тогда как флуоресценция FAD составляет лишь 10% таковой для рибофлавина; это, возможно, объясняется внутренним поглощением, обусловленным адениновой частью молекулы FAD, хотя с такой точкой зрения не согласуются данные о том, что в растворе две кольцевые системы молекулы FAD расположены ортогонально относительно друг друга. В общем случае флавиновые компоненты флавопротеидов также обнаруживают очень слабую флуоресценцию. Исключением является *дигидролипоилдегидрогеназа*, флуоресценция которой почти равна флуоресценции свободного FMN, что служит указанием на разворачивание динуклеотидной структуры. E_0' для флавопротеидов варьирует в широких пределах, причем на окислительно-восстановительный потенциал заметно влияет способ связывания кофермента с апобелком.

Вероятно, самые простые из флавопротеидов — это оксидазы, каждая из которых состоит только из белка и флавиннуклеотида.

В некоторых случаях флавиновый остаток принимает пару водородных атомов и восстановленная форма спонтанно восстанавливает O_2 до H_2O_2 . Однако иногда субстрат отдает флавину только один электрон, и тогда флавин осциллирует между окисленной и восстановленной семихинонной формами:



Любопытно, что оксидазы L-аминокислот из печени содержит две молекулы FAD на молекулу фермента, тогда как фермент почек — две молекулы FMN. Реакции такого типа — главный источник пероксида водорода в метаболических системах. Пероксид водорода используется в качестве окислителя несколькими пероксидазами (разд. 13.7.6), но большая часть образованного пероксида разрушается каталазой до H_2O и O_2 (разд. 13.7.6).

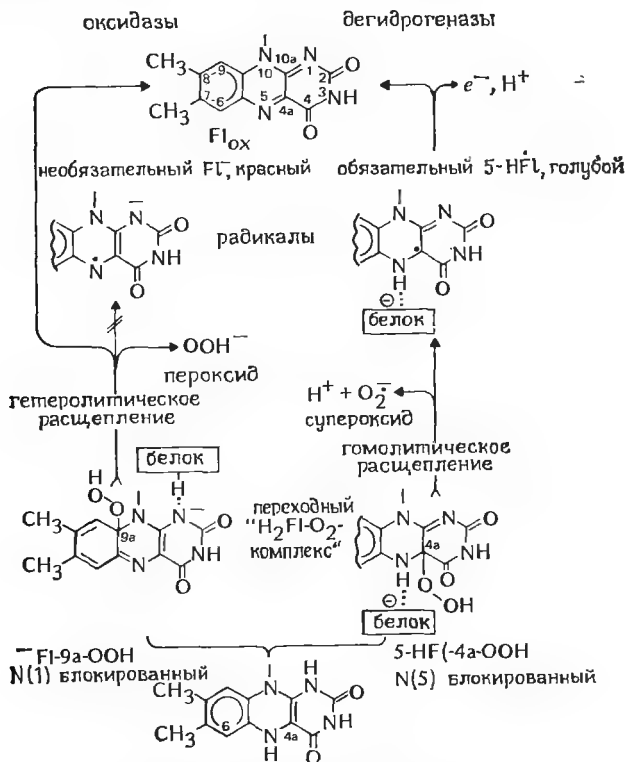


Рис. 13.10. Структуры частично восстановленных форм флавиновых нуклеотидов. Природа связи флавина с белком определяет, происходит ли образование синего или красного семихинона и является ли фермент оксидазой или дегидрогеназой. (Взято с некоторыми упрощениями из работы [Massey V., Hemmerick P., p. 245, in: P. D. Boyer, ed., The Enzymes, vol. XII, Academic Press, Inc., New York, 1976].)

Некоторые простые флавопротеиды представляют собой дегидрогеназы, которые переносят восстановительные эквиваленты от субстрата, например от алифатической цепи CoA-производных жирных кислот (гл. 17), и передают их другому флавопротеиду — электронпереносящему флавопротеиду (ЭПФ). Указанный простой флавопротеид является тетрамером из субъединиц с мол. массой 38 000, каждая из которых содержит одну молекулу FAD. ЭПФ — это димер из FAD-содержащих субъединиц (мол. масса ~ 29 000). $K_m^{\text{флави}}$ для ЭПФ составляет 2 мкмоль/л. ЭПФ уникален в том смысле, что он и восстанавливается, и окисляется флавопротеидом; ЭПФ переносит атомы водорода к третьему флавопротеиду — ЭПФ-дегидрогеназе, которая восстанавливает убихинон и таким образом поставляет электроны в основную электронпереносящую цепь митохондрий.

У анаэробных бактерий, фотосинтезирующих бактерий и синезеленых водорослей распространены простые *флаводоксины* с мол. массой 15 000 или 21 000, каждый из которых содержит одну молекулу FMN. Они могут восстанавливаться *гидрогеназой* или первичным акцептором электронов в фотосинтезе и могут в свою очередь восстанавливать другой флавопротеид, например *NADPH-редуктазу*. Флаводоксины легко образуют устойчивые синие семихиноны. E_0' для пары FMN/FMNH• составляет приблизительно от —100 до —200 мВ, а для пары FMNH•/FMNH₂ — около —400 мВ. Это самый низкий потенциал, известный для какого-либо флавопротеида. Он позволяет флаводоксинам заменять *ферредоксины* в фотосинтетических системах (разд. 16.4.1). Небольшой размер молекулы и хорошая способность флаводоксина к кристаллизации позволили определить последовательности аминокислот и трехмерные структуры (разд. 16.4.1). Изоаллоксазиновые кольца расположены в щели таким образом, что наружу выступает следующая часть молекулы:



Некоторые флавопротеиды переносят электроны между никотинамиднуклеотидами и дисульфидными структурами. *Липоамид-, глутатион- и тиоредоксиндегидрогеназы* относятся к числу наиболее известных флавопротеидов такого типа. Субстрат первого фермента — дисульфидгидрильная форма остатка липоевой кислоты, связанной с ε-аминогруппой лизинового остатка в трансацилтилазе; последняя входит в состав комплексов пируват- и α-кетоглутаратдегидрогеназ (разд. 12.2.1). Субстрат второго фермента — глутатион (γ-глутамилцистеинилглицин) — находится в свободной форме во всех клетках и окисляется в дисульфидную (—S—S—) форму посредством множества механизмов. В стацио-

метрического количества NADH (в случае глутатионредуктазы NADPH) приводит к образованию стабильного синего семихинона. Механизм реакции показан на рис. 13.11.

Взаимодействие тиоредоксина с его редуктазой характеризуется значительной видовой специфичностью; так, например, тиоредоксин из *E. coli* не может восстанавливаться тиоредоксинредуктазой из дрожжей. Механизм этой реакции представляется более сложным, чем изображенный на рис. 13.11, и, вероятно, включает циклические переходы редуктазы между более восстановленной формой фермента (FADH_2 и две сульфгидрильные группы) и полувосстановленной промежуточной формой.

13.2.1. Железосероцентры

В гл. 12 отмечалось участие железосероцентров в митохондриальном транспорте электронов. Три типа железосероцентров родственной структуры (рис. 13.12) широко распространены в природе; вероятно, все они участвуют в окислительно-восстановительных процессах. Простейшим из таких белков, функция которого

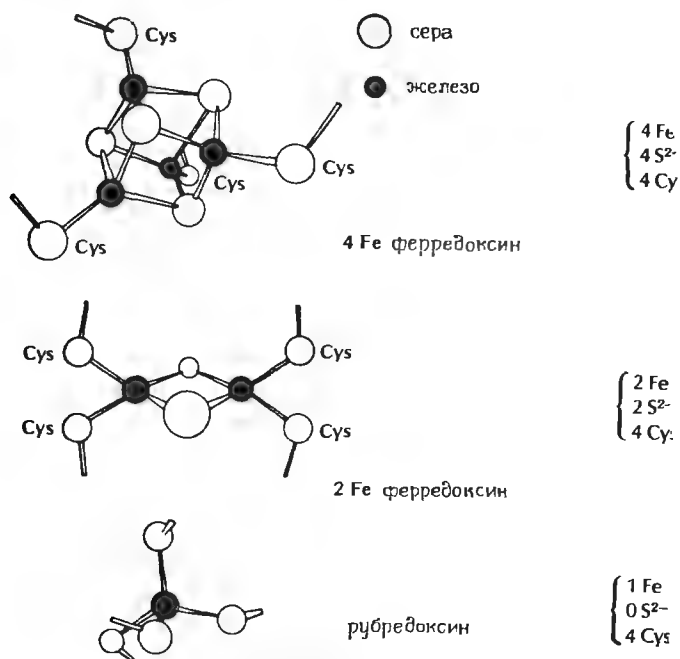
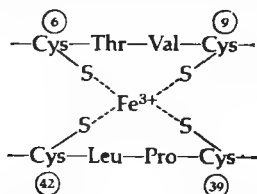


Рис. 13.12. Структуры железосероцентров. [Hall D. O., Rao K. K., Cammack R. The Iron-Sulfur Proteins: Structure, Function and Evolution of a Ubiquitous Group of Proteins, Sci. Prog. 62, 286, 1975.]

неизвестна, является *рубредоксин*, обнаруженный в *Clostridium pasteurianum* и других микроорганизмах. Он имеет одиночную полипептидную цепь, состоящую лишь из 54 аминокислотных остатков (мол. масса 6127), которая содержит один атом железа в тетраэдрической координации с сульфгидрильными группами четырех цистеиновых остатков в положениях 6, 9, 39 и 42; $E'_0 = -57$ мВ.



13.2.1.1. (Fe_2S_2)-протеиды

Растительные хлоропласты содержат растворимые *ферредоксины* (разд. 16.4.1), функциональная группа которых определена как (Fe_2S_2). Как и со всеми железосеропротеидами, кроме рубредоксина, подкисление среды приводит к выделению H_2S в количестве, стехиометрическом с содержанием железа. Ферредоксины хлоропластов — это небольшие белки (мол. масса 10 500, $E'_0 \approx -420$ мВ) с характерным спектром поглощения с максимумами при 420 и 460 нм. Другие «ферредоксины» неизвестной структуры связаны с тилакондными мембранами хлоропластов и обнаруживают низкие окислительно-восстановительные потенциалы (от -500 до -600 мВ). Сходство между *адренодоксином* из коры надпочечников и *путидаредоксином* из *Pseudomonas putida* обусловлено их размером; оба состоят из небольших белковых молекул, содержащих единственный (Fe_2S_2)-центр, и служат в качестве восстановительных агентов для цитохрома P_{450} (разд. 13.6.6); значения E'_0 для этих двух железосеропротеидов не столь отрицательны (около -275 и -230 мВ соответственно). При окисленном состоянии всех упомянутых ферредоксинов оба атома железа находятся в виде Fe^{3+} . Железосероцентр может акцентировать один электрон с переходом в состояние $Fe^{3+} \cdot Fe^{2+}$.

13.2.1.2. (Fe_4S_4)-протеиды

Бактериальные ферредоксины содержат один или два железосероцентра, обозначаемые как (Fe_4S_4); основная структура этих центров показана на рис. 13.12. Молекулярные массы ферредоксинов варьируют от 6300 до 9600; аминокислотные последовательности даже в отдаленно родственных видах обнаруживают значительную гомологию. Значения E'_0 ферредоксинов более отрица-

тельны (-400 мВ). Каждый атом железа скоординирован с атомами серы двух цистеиновых остатков, располагающихся в последовательности $-\text{Cys}-\text{X}-\text{Y}-\text{Cys}-$, и двух других цистеиновых остатков, которые могут быть относительно удалены, в связи с чем необходимо определенное складывание молекулы белка для сближения этих лигандов с атомом железа.

13.2.1.3. $(\text{Fe}_4\text{S}_4)_2$ -протеиды

Некоторые анаэробные бактерии, например *Micrococcus lactilyticus*, содержат ферредоксин с двумя группами (Fe_4S_4) , функционирующими независимо друг от друга. Структура каждой единицы (Fe_4S_4) , по существу, идентична структуре соответствующих единиц железосеропротеидов, имеющих только одну такую группу. Каждая группа опять-таки образуется из цистеинов, пространственно сближенных, как описано выше. Однако обе единицы не расположены на отдаленных частях цепи. Так, в ферредоксине из *Peptococcus aerogenes* одна группа образована с участием цистеинов в положениях 8, 11, 14 и 45, в то время как атом железа второго центра скоординирован с цистеинами 35, 38, 41 и 18. Как и во всех железосерокомплексах, в данном случае обе группы погружены внутрь белка, в связи с чем способ входа или выхода электронов при реакции с другими белками неясен. Эволюционно эта структура, возможно, представляет собой самый древний тип ферредоксина. В обоих классах окисленная форма центра может быть представлена как $\text{Fe}_2^{3+} \cdot \text{Fe}_2^{2+}$, а восстановленная форма — как $\text{Fe}^{3+} \cdot \text{Fe}_2^{2+}$.

Отдельную группу составляют высокопотенциальные железосеропротеиды (ВПЖП), обнаруженные в некоторых бактериях, например у *Chromatium* и *P. aerogenes*. Они тоже содержат один или два центра (Fe_4S_4) на одну молекулу, но E'_0 может иметь значения более положительные, чем $+300$ мВ. Структуру ВПЖП можно изобразить как $\text{Fe}_2^{3+} \cdot \text{Fe}_2^{2+}$. При восстановлении этот центр может акцептировать только один электрон, принимая форму $\text{Fe}_2^{3+} \cdot \text{Fe}_2^{2+}$. Железоцентр ВПЖП глубоко погружен в сильногидрофобную область молекулы. В растворителе, подобном диметилсульфоксиду, ВПЖП ведет себя как обыкновенный ферредоксин и легко может быть восстановлен до состояния $\text{Fe}^{3+} \cdot \text{Fe}_2^{2+}$. Таким образом, в различных видах организмов благодаря этим разнообразным, но родственным между собой железосеропротеидным структурам становятся возможными значения E'_0 в интервале от -450 до $+300$ мВ.

Обычно при исследованиях железосеропротеидов используется метод электронного парамагнитного резонанса. Как ферредоксины, содержащие 2 атома железа, так и ферредоксины с 4 атомами железа в окисленной форме диамагнитны, а при восстановлении становятся парамагнитными с большим сигналом ЭПР при $g \approx 1,94$

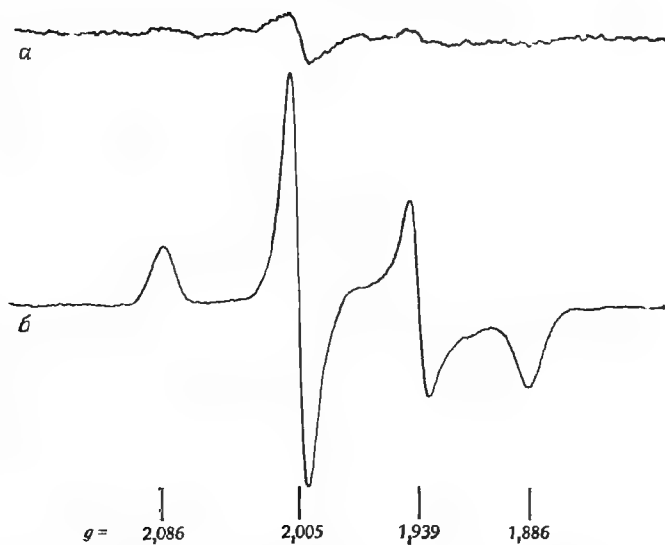


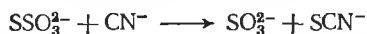
Рис. 13.13. Спектр ЭПР флавожелезосеропротеида из митохондрий сердца быка. *a* — окисленная форма; *b* — восстановленная форма, обнаруживающая сигнал свободного радикала от флавосемихинона при $g=2$ и восстановленного железосероцентра при $g=1,94$. [Beinert H., Iron-Sulfur Centers of the Mitochondrial Electron Transfer System, p. 83, in: W. Lovenberg, ed., The Iron-Sulfur Proteins, vol. III, Academic Press, Inc., New York, 1977.]

(рис. 13.13). Такое поведение может показаться парадоксальным. Спектры ЭПР в норме наблюдаются для Fe^{3+} , а не для Fe^{2+} , и притом при значениях g , превышающих значения g для свободного электрона (т. е. $>2,0023$). В окисленных ферредоксинах высокоспиновые Fe^{3+} -центры антиферромагнитно сопряжены, т. е. их спины нейтрализуются через мостиковые серные лиганды. При восстановлении неспаренный электрон одного Fe^{3+} нескомпенсирован, но сильно делокализован, т. е. он относится скорее ко всему центру (Fe_2S_2) или (Fe_4S_4), чем к одному атому железа; таким образом объясняется низкое среднее значение g , равное $\sim 1,94$. Ферредоксины с двумя центрами, содержащими 4 атома железа, ведут себя сходным образом, когда восстанавливается только один центр, но при восстановлении обоих центров они участвуют в спин-спиновом сопряжении, подобно паре стержневых магнитов, и парамагнетизм отдельных центров нельзя обнаружить. Поведение ВПЖП противоположно поведению ферредоксинов; будучи окисленными, они парамагнитны и становятся диамагнитными при восстановлении, обнаруживая только слабый сигнал окисленных ферредоксинов при $g=2,01$.

Гидрогеназы, очевидно, составляют особый класс железосеропротеидов. Ферменты, полученные из *C. pasteurianum*, *Desulfovib-*

rio и *Chromatium*, содержат три, два и один (Fe_4S_4)-центр на молекулу соответственно. Все они катализируют обмен орто- и параводородов, а также выделяют H_2 при восстановлении ферредоксинном. Детальный механизм действия этих белков остается невыясненным.

Предполагается, что сульфид, необходимый для образования железосероцентра, продуцируется реакцией с встречающимся повсеместно и содержащим железо ферментом *роданезой*, которая, как давно известно, катализирует реакцию между тиосульфатом и цианидом



Печеночные митохондрии содержат роданезу, связанную с белком, богатым железосероцентрами. Ниже дана предварительная схема,

Таблица 13.4
Некоторые типичные железосеропротеиды

Центр	Молекулярная масса	E'_0 , мВ	Источник
Fe-рубредоксин	6 000	—60	Клостридии (облигатные анаэробы)
(Fe_2S_2) -ферредоксины	10 600	—120	Хлоропласты шпината
	10 300	—400	<i>Microcystic</i> (сине-зеленые водоросли)
	21 600	—350	<i>Azotobacter</i> (аэробный, N_2 -фиксирующий)
	12 600	—360	<i>E. coli</i> (кишечная бактерия)
	12 500	—250	<i>P. putida</i> (аэробная бактерия)
(Fe_4S_4) -ферредоксины	12 500	—270	Кора надпочечников
	6 000	—330	<i>Desulfovibrio</i> (анаэробный, восстанавливающий SO_4)
	8 800	—380	<i>Bacillus</i> (почва, N_2 -фиксирующий)
$(\text{Fe}_4\text{S}_4)_2$ -ферредоксины	6 000	—395	Клостридии (облигатные анаэробы)
	10 000	—490	<i>Chromatium</i> (пурпурная серобактерия, фотосинтезирующая)
	15 000	—420	<i>Azotobacter</i> (аэробный, N_2 -фиксирующий)
(Fe_2S_2) -ВПЖП	30 000	+280	Комплекс III из митохондрий сердца
(Fe_4S_4) -ВПЖП	9 650	+350	<i>Chromatium</i> (пурпурная серобактерия, фотосинтезирующая)

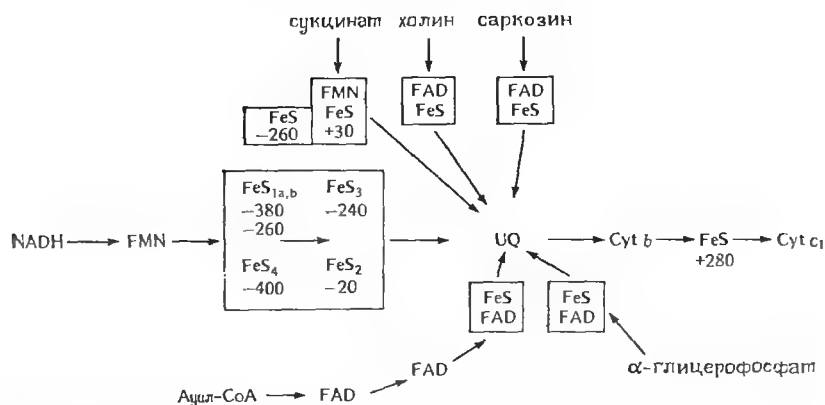


Рис. 13.14. Железосеропротениды в электронпереносящей цепи (E'_0 — в милднвольтах; UQ — убихинон).

кал). В действительности скорость образования синего семихинона у большинства флавопротенидов этой группы варьирует в широких пределах.

Дигидрооротатдегидрогеназа из митохондрий млекопитающих, участвующая в синтезе пиримидина (гл. 24), обладает совершенно иными свойствами. Фермент с мол. массой 61 000, по-видимому, содержит девять Fe^{2+} и два Zn^{2+} , но не имеет в своем составе ни флавина, ни железосероцентра. In vitro эта дегидрогеназа также восстанавливает O_2 до супероксида, но в митохондриях она восстанавливает цитохром *b*.

13.2.2.1. Флавопротениды и железосероцентры митохондрий

До последнего времени митохондриальная электронпереносящая цепь представлялась в виде устройства, где флавопротениды принимают входящие в цепь электроны субстратов, а остальная часть цепи организована в форме ряда цитохромов (разд. 13.3), свойства и поведение которых можно наблюдать посредством оптической спектроскопии. Применение метода ЭПР позволило обнаружить, что на самом деле цепь содержит большое число железосероцентров, превышающее число цитохромов, так что, по-видимому, она выглядит, как это представлено на рис. 13.14. До сих пор лишь несколько этих центров удалось отделить от других компонентов соответствующих комплексов.

Электроны от NADH и сукцината, генерируемых в цикле лимонной кислоты, а также электроны от CoA-производных жирных кислот (см. разд. 17.5.1) и других субстратов окисления, в том числе α-глицерофосфата, холина и саркозина, входят в электронпереносящую цепь через общий для всех акцептор — убихинон, кото-

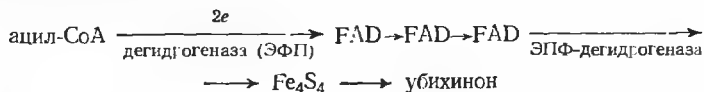
рый при этом восстанавливается. В каждом случае фермент, окисляющий соответствующий субстрат, представляет собой флавопротеид, который содержит железосероцентр в качестве интегрального компонента дегидрогеназного белка. Будучи восстановленными, эти центры дают спектры ЭПР, сходные с теми, которые приведены на рис. 13.13. Только окисление NADH убихиноном происходит с участием механизма аккумуляции энергии для синтеза АТР; во всех остальных электронпереносящих системах, включающих флавопротеид и убихинон, E_0 субстрата, как такового, слишком близка к E_0' убихинона, что делает невозможным образование АТР.

Комплекс I (разд. 12.4.1) осуществляет восстановление убихинона до семихинона за счет NADH. При расщеплении комплекса I удастся выявить по крайней мере 10 отдельных полипептидных цепей. Гидрофобная природа NADH-дегидрогеназы затрудняет получение нативного фермента в чистой форме. В лучшем препарате (мол. масса 70 000) на одну молекулу фермента приходится один FMN, который легко удаляется при низком pH, и один (Fe_4S_4) -центр. Свойства этого препарата, как и следовало ожидать, не идентичны со свойствами дегидрогеназы, находящейся в фосфолипидной среде комплекса I; так, например, K_m^{NADH} в растворе в 15 раз больше K_m^{NADH} в комплексе I (7 мкмоль/л). Существенное различие состоит также в том, что нативный комплекс NADH-дегидрогеназы содержит 16Fe и $16S^{-2}$ на одну молекулу FMN. Исследования спектров ЭПР помогли обнаружить четыре отчетливых центра, сигналы которых проявляются по мере увеличения количества, добавляемого NADH. Расположение этих центров, по-видимому, соответствует изображенному на рис. 13.14. Ингибиторы, препятствующие восстановлению убихинона электронами от NADH, например амитал, ротенон или пирридин, вероятно, действуют между центрами 1 и 4 и центрами 2 и 3.

Препятствия подобного рода затрудняют понимание функций сукцинатдегидрогеназы, для которой V_{max} в митохондриальной мембране вдвое выше, чем в растворе. Лучшие препараты состоят из белка (мол. масса $\sim 70\,000$), который содержит ковалентно связанный FAD и два (Fe_2S_2) -центра; этот белок тесно связан с другим белком (мол. масса $\sim 27\,000$), также имеющим (Fe_4S_4) -центр, но не содержащим флавина. Приведенные сведения о структуре комплекса II согласуются с данными ЭПР о наличии трех отдельных железосероцентров в этом комплексе. Сукцинатдегидрогеназа легко ингибируется оксалоацетатом и малонатом, для которых значения K_i составляют 1,5 и 20 мкмоль/л соответственно, тогда как $K_m^{сукцинат} = 300$ мкмоль/л.

Молекулярные свойства других флавожелезосеропротеидов митохондрий сравнительно мало известны. Субстратом ЭПФ-дегид-

рогеназы является флавопротейд (ЭПФ); этот флавопротейд восстанавливается при взаимодействии с флавиновой дегидрогеназой, которая окисляет CoA-производные насыщенных жирных кислот до ненасыщенных (гл. 17); электронпереносящая цепь выглядит следующим образом:



Комплекс III — сегмент электронпереносящей цепи, где совершается восстановление цитохрома с восстановленным убихиноном. Этот комплекс включает железосеропроteid, для которого $E'_0 = +280$ мВ; последний, очевидно, относится к числу высокопотенциальных железосеропроteidов. Возможно, что ингибирование аптимицином А объясняется его специфическим взаимодействием с этим центром.

13.3. Цитохромы

Цитохромы встречаются практически во всех аэробных организмах. В общем случае содержание цитохрома в тканях соответствует дыхательной активности. Самые высокие концентрации обнаружены в сердечной и других активно работающих мышцах, как, например, летательные мышцы птиц и насекомых. Меньшие количества присутствуют в печени, почках, мозге и в гладких мышцах. Самые низкие концентрации цитохромов наблюдаются в коже и легких. В опухолевой и эмбриональной ткани содержание цитохромов необычайно низко; это связано с тем, что в этих тканях генерация энергии идет в основном по анаэробным путям метаболизма.

Ранние исследования цитохромов, проведенные Кейлином, показали, что в присутствии окисляемых субстратов и в отсутствие кислорода при спектроскопическом анализе суспензии ткани обнаруживается серия четко выраженных полос поглощения. Добавление кислорода приводило к исчезновению этих полос, которые заменялись группой менее интенсивных и более размытых полос. Результаты этих наблюдений позволили Кейлину установить присутствие трех цитохромов, которые он обозначил как *a*, *b* и *c*. Каждый из них в восстановленной форме характеризовался несколькими максимумами поглощения (табл. 13.5). Из этой группы восстановленный цитохром *a* осуществляет восстановление молекулярного кислорода и восстанавливается цитохромом *c*. По мере идентификации других цитохромов каждый из них обозначался в соответствии с тем из первоначальных цитохромов, с которым у него были наиболее похожие спектроскопические показатели, напри-

мер b_1 , b_2 , b_3 , b_4 и т. д. Эту номенклатуру не следует рассматривать как указание на *обязательное* близкое родство их структур и на одинаковое значение E'_0 или на признак равноценности их роли в процессе электронного транспорта.

Добавление промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты в суспензию ткани в анаэробных условиях приводит к быстрому восстановлению цитохромов в последовательности b , c_1 , c и a ; при введении кислорода эти компоненты быстро окисляются. Однако окисление может быть предотвращено в присутствии CN^- , N_3^- , S^{2-} и CO . Поскольку дыхание большинства тканей животных подавляется на 90% указанными ингибиторами, то, по-видимому, заключительная стадия процесса дыхания животных клеток в норме протекает по электронной цепи, ведущей к цитохромоксидазе.

Кроме цитохромов b_5 и P_{450} , локализованных в эндоплазматической сети, все цитохромы животных клеток расположены в митохондриальном белок-липидном комплексе. Только цитохром c легко удается получить в форме гомогенного, водорастворимого белка путем экстракции водными растворителями; все остальные цитохромы остаются связанными с нерастворимыми митохондриальными частицами. Однако обработка митохондрий или митохондриальных фрагментов детергентами, например дезоксихолатом или додецилсульфатом, позволяет выделить каждый из митохондриальных цитохромов в относительно чистой форме. Следует предупредить, однако, что свойства цитохромов в водном растворе детергента могут заметно отличаться от их свойств в привычной для них гидрофобной среде.

Цитохромы b обладают самым низким потенциалом; E'_0 для выделенного из сердца цитохрома b в водном растворе составляет -340 мВ, тогда как в митохондрии, судя по его поведению, E'_0 составляет около $+30$ мВ. Два, по-видимому, различных цитохрома b обнаружены в митохондриях, оба в комплексе III (разд. 12.4.1). Их спектральные свойства показаны в табл. 13.5. Особенно примечателен тот факт, что для цитохрома b_1 E'_0 увеличивается от -30 до $+245$ мВ в присутствии АТР. Физиологический смысл этого явления неизвестен. Посредством экстракции детергентом удалось выделить только денатурированные формы этого цитохрома (мол. масса 28 000). Протетической группой, по-видимому, является гем (железопротопорфирин IX; разд. 12.4). Восстановленная форма не подвергается аутоокислению, а окисленная форма не реагирует с цианидом.

Цитохром c_1 прочно связан в митохондриальной мембране. Его спектральные свойства напоминают свойства цитохрома c (табл. 13.5), который содержит идентичную протетическую группу, сходным способом присоединенную к белку. Цитохром c_1 получен в форме агрегата с мол. массой 31 000. Содержащая двухвалентное железо форма цитохрома, а также его полимер не могут прямо

Таблица 13.5
Свойства цитохромов млекопитающих

Цитохром	Максимумы поглощения восстановленных форм			E'_0 , мВ
	α , нм	β , нм	γ , нм	
a_3	600		445	+200
a	605	517	414	+340
c	550	521	416	+260
c_1	554	523	418	+225
b	563	530	430	+30
b_t	565	535, 528	430	-30(+245)
b_5	557	527	423	+0,03

реагировать с цитохромоксидазой. Добавление небольшого количества цитохрома c создает условия для быстрого окисления субстратных количеств цитохрома c_1 цитохромоксидазой. Цитохромы c и c_1 образуют довольно прочный комплекс, не разделяющийся при хроматографии на сефадексе. Реакция между этими двумя цитохромами происходит с исключительно высокой скоростью: константа скорости второго порядка для восстановления цитохрома c посредством цитохрома c_1 при pH 7,4 составляет $3.3 \cdot 10^{10}$ л·моль⁻¹·с⁻¹. В митохондриальной структуре, для того чтобы вступить в реакцию с цитохромоксидазой, цитохром c должен отделиться от цитохрома c_1 .

Цитохромы c выделены в чистом виде из многих растений, животных и грибов и изучены более подробно, чем любой другой белок, участвующий в окислительно-восстановительных процессах. Полные аминокислотные последовательности известны для цитохромов c , полученных из более, чем 70 видов. Значение этих данных обсуждается в гл. 27. Материал, излагаемый здесь, относится только к аспектам функционирования этого переносчика электронов, который в процессе электронного транспорта принимает электроны от цитохрома c_1 и передает их цитохрому $a+a_3$. При нейтральном pH ферроцитохром c не реагирует с CN^- , S^{2-} или N_3^- . Данные многочисленных химических экспериментов, подтвержденные рентгеноструктурным анализом кристаллов ферроцитохрома c , позволяют объяснить такое отсутствие активности тем, что гемовое железо полностью скоординировано; четыре положения заполнены азотными атомами гема, одно — имидазольным азотом гистидина-18 и одно — серой метионина-80 (разд. 12.4). Поэтому внешние реагенты не имеют доступа к железу. Действительно, как показано на рис. 4.1 и 13.15, вся плоскость гема лежит в гидрофобной щели, а остатки пропионовой кислоты гема глубоко вдвинуты

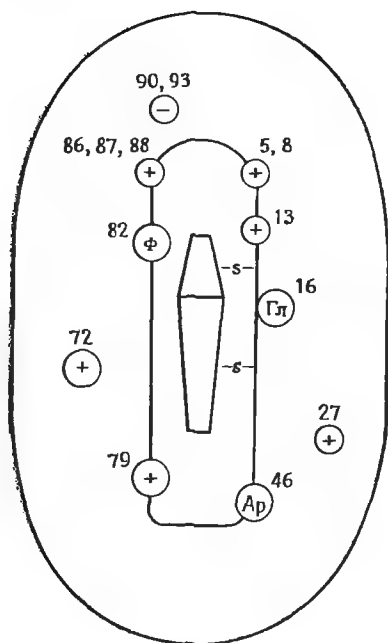


Рис. 13.15. Схематическое изображение гемовой щели цитохрома *c* из голубого тунца (полную структуру см. на рис. 4.1). Цифрами указаны положения остатков, знаками плюс и минус — положительно и отрицательно заряженные остатки. Гл — глутамин, Ф — фенилаланин, Ар — ароматический. Показаны только те остатки, которые типичны для большинства цитохромов *c*. [Dickerson R. E., Timkovich R., p. 484, in: P. D. Boyer, ed., *The Enzymes*, vol. XI, 3d ed., Academic Press, Inc., New York, 1975.]

в щель и образуют водородные связи с Trp-59 и Tyr-48. Только один край плоскости молекулы гема находится на поверхности молекулы и доступен для других реагентов. Узкий канал обнаруживается с каждой стороны гема, но только очень маленькие гидрофобные молекулы, вероятно, могут проходить через него. Phe-82 играет роль своего рода пробки, блокирующей вход молекул извне в гемовую щель.

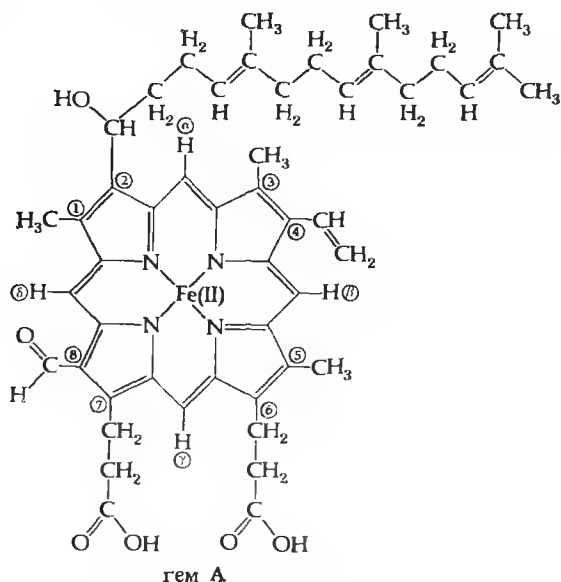
Поскольку цитохром *c* принимает электроны от другого гемопротейда и должен отдавать их опять-таки гемопротейду, возникает вопрос, каким образом происходит перенос электрона при нормальных физиологических условиях. Не исключено, что в результате связывания цитохрома *c* с c_1 или с цитохромоксидазой создается возможность для возникновения контакта между краями плоскостей соответствующих гемов. Но при этом все же не получен ответ на прямой вопрос о механизме переноса электронов к Fe^{3+} или от Fe^{2+} . В случае реакции цитохрома *c* с цитохромоксидазой рассчитана скорость квантовомеханического тунелирования, причем электрон рассматривался как волновая функция; получено, что возможные значения скорости этой реакции имеют тот же порядок, что и наблюдаемая в действительности скорость. Детали связывания этих белков друг с другом остаются недостаточно понятными. Эта проблема общая для многих реакций мито-

хондриального транспорта; во всех случаях белок-белковых взаимодействий с участием железосероцентров и гемопротеидов функциональные группы, изменение степени окисления которых обнаруживается спектрофотометрически или по спектрам ЭПР, погружены глубоко в молекулу белка и не могут вступать в прямой физический контакт друг с другом.

Представляется очевидным, что связывание цитохрома *c* с цитохромоксидазой достигается благодаря поясу катионных групп, в основном остатков лизина и аргинина, на «верхней» стороне молекулы; особое значение имеет Lys-13, находящийся как раз на вершине одного из каналов. Среди всех известных в настоящее время белков только у цитохрома *c* наблюдается такое обособление катионных групп; на другой стороне молекулы находится пояс анионных остатков глутамата и аспартата, которые могут иметь отношение к связыванию цитохрома *c* с редуктазой (цитохромом c_1) или вообще к положению фермента в электронпереносщей цепи. Совершенно особое место принадлежит группе из 11 остатков (положения от 70-го до 80-го в последовательности аминокислот), которые остаются неизменными у всех исследованных цитохромов животных и растений. Эта полоса сложена таким образом, что образует «левую сторону» гидрофобного окружения гема. Эти особенности структуры, равно как вся трехмерная структура в целом, идентичны у всех цитохромов *c* эукариот. Так как в общем число аминокислотных замен во всей последовательности цитохрома *c* довольно постоянно для каждого из всех исследованных видов и так как все известные в настоящее время цитохромы *c* эукариот эффективны в качестве субстратов для цитохромоксидазы из сердца лошади, представляется вероятным, что современная трехмерная структура цитохрома *c* возникла более миллиарда лет назад и с тех пор осталась в основном неизменной. Обработка очищенного белка смесью липидов митохондрий или очищенным фосфатидилэтаноламином приводит к образованию липидрастворимого комплекса, который на 15% может состоять из цитохрома *c*. В этой форме цитохром *c* легко взаимодействует с цитохромоксидазой в качестве ее субстрата и в этом отношении ведет себя подобно цитохрому *c*, находящемуся в митохондриях.

Цитохромоксидаза — конечное звено цепи — является ее единственным компонентом, который способен восстанавливать кислород. На основании спектров поглощения препаратов из дрожжей и сердечной мышцы, обработанных CO или CN и восстановленных субстратом, ранее был сделан вывод о том, что два отдельных цитохрома a и a_3 , вероятно, находятся в конце цепи. Считалось, что цитохром a_3 способен самоокисляться при низком парциальном давлении O_2 и соединяться с CO и CN^- , а цитохром a — нет. Поэтому цитохром a_3 рассматривался в качестве истинной оксидазы. Однако в действительности митохондрии содержат лишь один ком-

понент, который можно назвать цитохромоксидазой. Это большая сложная молекула, содержащая два атома меди и две молекулы уникального гема А, показанного ниже, необычность которого состоит в том, что он содержит длинную этилфарнезилную группу, присоединенную к одному из пиррольных колец:

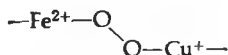


Белковый комплекс, который пересекает внутреннюю митохондриальную мембрану, имеет мол. массу $\sim 200\,000$ и состоит из семи различных субъединиц с мол. массой: I) 40 000, II) 33 000, III) 22 000, IV) 14 500, V) 13 000, VI) 12 700, VII) 4600. Субъединицы I, II и III исключительно гидрофобны. *In situ* субъединицы III, VI и VII располагаются на наружной поверхности мембраны, субъединица IV — на стороне, обращенной к матриксу, в то время как субъединицы I и V погружены в мембрану. Показано, что субъединица III входит в центр связывания цитохрома *c*. Ничего не известно о центре нековалентного связывания гема или меди. O_2 , по-видимому, подходит к цитохромоксидазе со стороны митохондриального матрикса, а это означает, что гем отделен от цитохрома *c* всей толщиной мембраны.

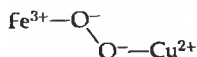
Цитохромоксидаза катализирует четырехэлектронное восстановление молекулы кислорода O_2 до воды. В ходе этого процесса, вплоть до полного завершения восстановления, не обнаружено отделения каких-либо промежуточных продуктов. Такое течение процесса термодинамически оправдано, поскольку для одноэлектронной стадии $O_2 + e \rightarrow O_2^{\cdot -}$, $E'_0 = -330$ мВ и для двухэлектронного

восстановления $O_2 + 2e \rightarrow O_2^{2-}$, $E'_0 = +310$ мВ, тогда как для реакции $O_2 + 4e + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$, $E'_0 = 840$ мВ. Однако посредством экспериментальных манипуляций было продемонстрировано образование как O_2^- , так и O_2^{2-} .

Молекула цитохромоксидазы, очевидно, должна обладать внутренней симметрией, имея реакционный центр, к которому ферроцитохром может доставлять электроны и к которому может присоединяться O_2 ; этот центр включает как гемы, так и атомы меди. Несмотря на то что молекула фермента, по всей вероятности, симметрична, методом ЭПР удастся обнаружить только один атом гемового железа и один атом меди, что указывает на антиферромагнитное сопряжение спинов двух других атомов. Значения E'_0 для двух атомов железа, по-видимому, существенно различаются: для атома с более высоким потенциалом, поведение которого соответствует цитохрому a_3 , $E'_0 = +340$ мВ, тогда как для атома железа цитохрома a $E'_0 = +200$ мВ. CN^- -связывающий центр — либо Fe^{3+} цитохрома a_3 , либо неразличимый посредством ЭПР атом меди. Когда присоединение ферроцитохрома c происходит в отсутствие O_2 , электроны продвигаются, возможно через медь, к гемовому железу, восстанавливая один атом железа и один атом меди до Fe^{2+} и Cu^+ соответственно, которые можно обнаружить методом ЭПР. Химические восстановители могут восстановить весь центр, но ферроцитохром c не может легко восстанавливать вторую пару металлов. O_2 связывается с Fe^{2+} гема с образованием промежуточного комплекса, напоминающего оксигемоглобин. Если неорганические модели процесса правомочны, второй ион металла, возможно это ассоциированный атом меди, должен связываться с другим атомом кислорода в паре



для облегчения полного восстановления кислорода и последующего отделения от иона металла в виде пары гидроксидных ионов. Однако эти подробности еще не получили полного подтверждения. В качестве возможного интермедиата привлекает внимание



где пероксидная группа удерживается на месте своего образования до момента введения второй пары электронов. Химически восстановленная оксидаза очень медленно восстанавливает O_2 . Связывание цитохрома c влияет на реакционную способность активного центра к O_2 , вызывая ее увеличение. Таким образом, подлин-

ный восстановитель O_2 — это комплекс цитохром-с-цитохромоксидаза.

Напомним, что перенос электрона $cyt\ c \xrightarrow{e} cyt\ aa_3 \xrightarrow{e} O_2$ сопряжен с запасанием энергии и образованием АТФ. Хотя механизм этого процесса еще неясен, при его объяснении следует учитывать тот факт, что в присутствии АТФ E'_0 для цитохрома a_3 падает более чем на 200 мВ, составляя всего около +160 мВ. Физические причины, обуславливающие те свойства, по которым различаются a - и a_3 -формы, пока еще непонятны, но отметим, что суммарное значение мол. массы фермента (по сумме всех компонентов) составляет 110 000, тогда как мол. масса изолированного фермента по меньшей мере вдвое больше, а в мембране он может существовать в еще более высокополимерной форме. Это обстоятельство могло бы способствовать расположению одной из гем-купрогрупп вблизи наружной поверхности мембраны, а другой на стороне матрикса, так что гем и медь в каждом из цитохромов a и a_3 должны были бы находиться в различном окружении.

Некоторые другие ферменты также могут катализировать многоэлектронные восстановительные реакции без освобождения или различного участия промежуточных продуктов. Купропротеиды *церулоплазмин* и *лакказа* прямо восстанавливают молекулярный кислород до H_2O . Оба белка содержат три различных типа двухвалентной меди. Каждое из шестиэлектронных восстановлений N_2 и NO_2^- до NH_3 и SO_3^{2-} до S^{2-} у микроорганизмов катализируется одним ферментом. Это явление описывается ниже.

13.4. Бактериальные цитохромы и перенос электронов

Способ дыхания клеток высших растений, дрожжей и грибов напоминает таковой у животных клеток. Дыхание осуществляется в митохондриях, содержащих ферменты цикла лимонной кислоты, систему организованного переноса электронов с цитохромами, напоминающими цитохромы животных, и связанную с ней фосфорилирующую систему. Эффективность фосфорилирования в этих системах варьирует; например, представляется вероятным, что пункт сопряжения, связанный с первой стадией окисления $NADH$, может отсутствовать в дрожжевых митохондриях. Бактериальные клетки не имеют органелл, напоминающих митохондрии. Дыхательные системы бактерий, которые можно выделить из препаратов разрушенных клеток, сосредоточены в маленьких, богатых липидами нерастворимых частицах разного размера, представляющих фрагменты клеточной мембраны. Эти частицы, содержащие дегидрогеназы, цитохромы и железосеропротеиды, осуществляют окислительное фосфорилирование. Дегидрогеназы в общем случае напоминают дегидрогеназы клеток млекопитающих. Окислительное фосфорилирование в бактериях по своему характеру существенно отличается от аналогичного процесса в митохондриях млекопитающих. Ни разу не был обнаружен дыхательный контроль; отсутствие ADP или P_i не лимитирует скорость дыхания, и бактериальные системы обычно нечувствительны к разобщающему воздействию динитрофенола. По спектрам поглощения цитохромы

бактерий классифицируются как цитохромы *a*, *b* и *c*; однако такое деление цитохромов не обязательно означает, что их взаимоотношения в процессах переноса электрона соответствуют тем, которые наблюдаются в митохондриях животных клеток. Особенно широко распространен тип цитохрома *c*.

Облигатные и некоторые факультативно аэробные бактерии восстанавливают O_2 за счет продуктов метаболизма органических соединений; их электронпереносящие системы напоминают таковые в клетках эукариот. Другие бактерии используют сероводород и тиосульфат вместо органических соединений. В некоторых случаях сульфат и нитрат служат в качестве терминальных окислителей. Во всех случаях электронпереносящая цепь бактерий включает ряд цитохромов и некоторое (обычно неустоявшееся) число железосеропротендов. Вообще электронпереносящие цепи бактерий удивительно разнообразны, что, однако, обусловлено вариативностью структур компонентов одного и того же набора *b*-, *c*- и *a*-типов цитохромов. Это будет проиллюстрировано лишь на нескольких примерах. У *Micrococcus denitrificans* имеется цитохром *c*-типа с гемом, связанным так, как у эукариот. Этот цитохром может медленно окисляться цитохром-оксидазой из сердца быка, тогда как цитохромоксидаза этой бактерии может окислять цитохром *c* из сердца так же быстро, как и свой собственный субстрат. Известно лишь несколько других примеров такого рода.

Некоторые бактерии, по-видимому, содержат более одного аутооксидируемого цитохрома *a*-типа, и кроме того, у бактерий широко распространен гемопротенд, который был обозначен как цитохром *o*. Он имеет простетическую группу, напоминающую таковую цитохрома *c*, и, вероятно, служит в качестве терминальной оксидазы в клетках, в которых он присутствует. Белок из *Rhodospirillum rubrum* (цитохром *cc*) — простой прочный димер двух цитохромов *c*; он способен самоокисляться и ингибироваться CO и поэтому может рассматриваться как примитивное устройство, напоминающее цитохром $a+a_3$ в митохондриях.

Дыхательные частицы из *E. coli*, которые осуществляют фосфорилирование с O_2 или NO_3^- в качестве акцептора, содержат цитохромы *b*, *a*, *a*₁, *a*₂ и *o*. В растворимой фракции, полученной из этих клеток, обнаружены два цитохрома *c*-типа: *c*₅₀₀ и *c*₅₅₂, а также цитохром *b*₅₆₂. Последний имеет потенциал E_0' , равный +113 мВ, т. е. несколько выше, чем для большинства цитохромов *b*-группы, тогда как цитохром *c*₅₅₂ легко окисляется цитохромоксидазой из сердца лошади. Частицы из *Azotobacter vinelandii* содержат флавопротенд и цитохромы *b*, *c*, *c*₅, *a*₁ и *a*₂ в эквимольных количествах, а также восьмикратный молярный избыток убихинона. Электронный перенос в этой системе подавляется антимонином А и CN^- , напоминая в этом отношении митохондриальную систему. Переносящая система *Mycobacterium phlei*, похожая на переносящую систему более высоких форм, представляет интерес, так как в ней витамин K_3 , а не убихинон служит в качестве связующего звена между NADH-дегидрогеназой и цитохромом *b*. Найдентифицированное соединение, чувствительное к облучению при 360 нм, связывает сукцинатдегидрогеназу с цитохромом *b*, который окисляется обычной цепью, содержащей цитохромы *c*₁, *c*, *a* и *a*₃. В табл. 13.6 перечислены некоторые бактериальные цитохромы.

Цитохромы полностью отсутствуют в клетках, осуществляющих процессы брожения облигатных анаэробов, например *Clostridium*, и у факультативных аэробов, например *Pneumococcus* и *Staphylococcus*. Потребление кислорода клетками вышеуказанных видов объясняется активностью самоокисляющихся флавопротендов. Выполнены обширные исследования с цитохромами анаэробных бактерий, содержащих электронпереносящую цепь, а именно хемосинтезирующих бактерий, для которых N_2 , SO_4^{2-} , NO_3^- или Fe^{3+} служат в качестве терминальных окислителей. Все эти организмы содержат цитохромы, участвующие в восстановлении окислителя. Необходимо подчеркнуть, что присутствие цитохрома *c* обнаруживают по данным спектроскопии, а именно по полосам поглощения его восстановленной формы при 550, 525 и 415 мн. Этот спектр характерен для простетической группы, тогда как окислительно-восстановительный потенциал,

Таблица 13.6
Некоторые бактериальные цитохромы

Цитохром	Источник	Максимумы поглощения восстановленной формы			E'_0 , мВ	Реакция с O_2
		α , нм	β , нм	γ , нм		
a_1	<i>E. coli</i>	590			147	+
a_2	<i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Pseudomonas</i>	652	629	460		+
b_1	<i>E. coli</i> , <i>Azotobacter</i>	560	530	426	250	—
b_{562}	<i>E. coli</i>	562	532	427	35	—
b_4	<i>Hemophilus (Micrococcus)</i>	554	521	418	180	
c	<i>E. coli</i> , <i>Acetobacter</i>	568				+
c_2	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	550	521	416	320	—
c_3	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	552	522	418	—205	+
c_4	<i>Azotobacter</i>	551	522	418	300	—
c_5	<i>Azotobacter</i>	555	521	418	320	—
c_{551}	<i>Pseudomonas</i>	551	521	416	246	—
c_{552}	<i>Chromatium</i>	552	523	416	10	+
Цитохромонд c	<i>R. rubrum</i>	568		421	—8	+
Цитохромонд c	<i>Chromatium</i>	565		426	—5	+

по-видимому, отражает способ присоединения к белку, а также размер, конформацию и состав белка.

Самый низкий потенциал зарегистрирован для цитохрома c_3 из *Desulfovibrio desulfuricans*, E'_0 которого составляет —200 мВ, т. е. на 500 мВ ниже, чем E'_0 цитохрома c из сердца лошади; однако эта величина достаточна для восстановления SO_4^{2-} до SO_3^{2-} ($E'_0 = -200$ мВ) посредством H_2 при pH 7,0 ($E'_0 = -400$ мВ). Этот необычный цитохром (мол. масса 12 000) содержит четыре гемовых группы в одной молекуле. Организмы, восстанавливающие нитраты, например *Micrococcus denitrificans*, содержат цитохромы с более традиционным окислительно-восстановительным потенциалом, достаточным для восстановления NO_3^- до NO_2^- ($E'_2 = +0,5$ В). Предполагают, что в процессе этих реакций может образовываться АТФ. Цитохромы c фотосинтезирующих бактерий обнаруживают значение E'_0 в пределах от 0 до +0,35 В.

Классификация цитохромов на основе спектров поглощения может ввести в серьезное заблуждение при обращении к вопросу о функциях этих соединений. В таком организме, как *Hemophilus parainfluenzae*, имеющем несколько цитохромов c , эти цитохромы могут функционировать как электронпереносящая цепь благодаря различиям в потенциалах, тогда как у *Pseudomonas aeruginosa* может прекрасно использоваться последовательный перенос от гема цитохрома c -группы к гему цитохрома a_2 -группы на поверхности одного и того же белка. Несмотря на очевидное разнообразие десятков различных бактериальных цитохромов, принципы переноса электронов в митохондриях млекопитающих в рав-

ной мере применимы к этим более примитивным организмам. Интересен факт существования обратного потока электронов в некоторых бактериях. Например, E_0' для $S^{2-} \rightarrow SO_3^{2-}$ составляет -120 мВ, и все же *Thiobacillus* использует этот процесс для восстановления NAD^+ . Это становится возможным благодаря образованию АТФ при окислении некоторой части субстрата цепью, ведущей к O_2 или NO_3^- , и использованию энергии АТФ для передвижения электронов от восстановленного цитохрома c_{552} через цитохромы b и флавопротид к NAD^+ аналогично процессу, при котором сукцинат может восстанавливать NAD^+ в митохондриях (разд. 12.5).

13.4.1. Флавоцитохромы

Многие организмы содержат белки, которые включают как флавиновый нуклеотид, так и цитохром. Наиболее известный белок такого типа — дрожжевая $L(+)$ -лактатдегидрогеназа, которая состоит из четырех идентичных субъединиц (молекулярная масса 57 500), каждая из которых содержит один FAD и один цитохром b , подобный цитохрому b_5 печени (см. ниже). Окисление этой дегидрогеназой $L(+)$ -лактата и восстановление митохондриального цитохрома c относится к числу поставляющих энергию процессов.

13.4.2. Формиатдегидрогеназа

E. coli содержит специальную дегидрогеназу для формиата, которая в норме, по-видимому, контактирует с железосеросодержащей нитратредуктазой. Эта дегидрогеназа (молекулярная масса $\sim 600\,000$) имеет субъединичную структуру $\alpha_4\beta_4\gamma_2$. Каждая молекула фермента содержит четыре гема цитохрома b -типа, четыре (Fe_4S_4) -группы, четыре атома молибдена и четыре атома селена. Путь электронов неизвестен. Убихинон облегчает перенос электронов к нитратредуктазе. Другие микроорганизмы также имеют сложные формиатдегидрогеназы различного состава, например использующие NAD^+ в качестве акцептора электронов и восстанавливающие ферредоксин или лишенные одного гема и восстанавливающие какой-либо цитохром c в мембране.

13.4.3. Сульфитоксидаза

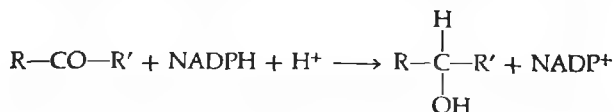
Сульфитоксидаза печени, окисляющая SO_3^{2-} до SO_4^{2-} , локализована в межмембранном пространстве митохондрии. Фермент представляет собой димер двух идентичных субъединиц (молекулярная масса 57 000), каждая из которых содержит один гем и один атом молибдена. Последний (в форме Mo^{6+}) непосредственно принимает электроны от SO_3^{2-} , превращаясь в Mo^{5+} , способный восстанавливать гем. Полностью восстановленный фермент имеет форму $Mo^{5+}-Fe^{2+}$, которая легко обнаруживается методом ЭПР. In situ восстановленный фермент передает электроны цитохрому c , так что отношение P/O для окисления SO_3^{2-} составляет единицу.

Когда в рацион крысы вводили вольфрам (WO_4^{2-}), сульфитоксидазная активность митохондрий заметно снижалась, и можно было выделить свободный от молибдена белок, представляющий собой гемсодержащий апофермент. Последний может активироваться посредством добавления Mo^{6+} -пептида, получаемого из материала внутренней поверхности наружной мембраны нормальных печеночных митохондрий.

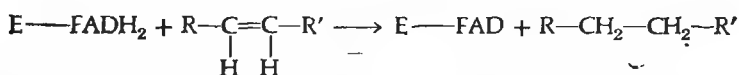
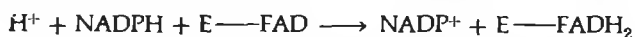
13.5. Восстановительные системы

Синтез различных компонентов клетки связан с одной или более восстановительными стадиями реакционной последовательно-

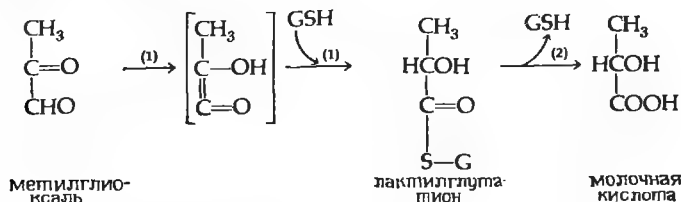
сти. Почти всегда восстановление обеспечивается за счет восстановленных пиридиннуклеотидов NADH или NADPH. Альдегиды и кетоны восстанавливаются простыми дегидрогеназами



Ненасыщенные связи восстанавливаются флавопротеидами с использованием восстановленного пиридиннуклеотида в качестве донора электронов, подобно тому как это происходит при синтезе жирных кислот (гл. 17):



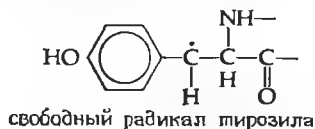
Дисульфиды при взаимодействии с рядом флавопротеинов, описанных ранее (разд. 13.2), также восстанавливаются, давая сульфгидрильные группы. Глутатион служит в качестве кофермента для *глиоксалазы*, которая катализирует внутримолекулярное окисление — восстановление метилглиоксала до лактата. В действительности глиоксалаза состоит из двух ферментов, причем не обнаружено никакой дополнительной простетической группы. Глиоксалаза катализирует реакцию



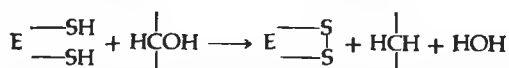
13.5.1. Рибонуклеотидредуктаза

Своеобразным набором компонентов характеризуются системы, восстанавливающие рибонуклеотиды до дезоксирибонуклеотидов (гл. 24). В бактериях обнаружены две системы такого типа. У *L. leichmanii* такая система содержит кобаламин (гл. 50) и неидентифицированный органический свободный радикал. Остальные подробности малоизвестны. Редуктаза *E. coli* (мол. масса 160 000) состоит из неидентичных субъединиц. Субстрат, по-видимому, входит в щель, на одной стороне которой находятся две —SH-группы, происходящие от одной субъединицы, а на другой — Fe²⁺ и орга-

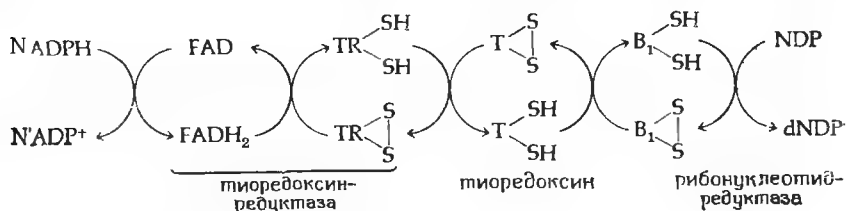
нический свободный радикал, который, вероятно, представляет собой бензильный углеродный атом тирозинового остатка в полипептидной цепи.



Механизм реакции неясен, но из общих соображений может быть представлен как

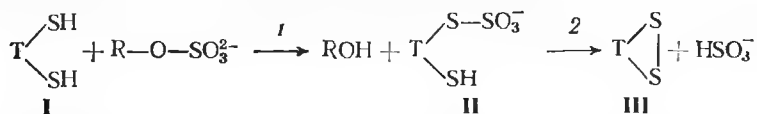


Восстановление дисульфидной группы редуктазы может совершаться за счет восстановленной формы тиоредоксина (гл. 24). Таким образом, полная последовательность выглядит следующим образом:



13.5.2. Восстановление сульфата

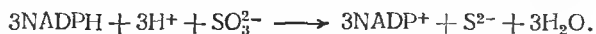
Восстановление сульфата характерно для метаболизма многих бактерий, водорослей и растений, но не животных. В начальной стадии происходит образование из ATP и сульфата фосфоаденозиндифосфосульфата (PAPS, гл. 20). Именно в такой форме сульфат восстанавливается бактериями; в клетках водорослей и высших растений восстановлению предшествует гидролитическое отщепление 3-фосфатной группы PAPS, в результате чего образуется аденозиндифосфосульфат (APS). В обоих случаях эфир сульфата реагирует с восстановленным тиоредоксином (I) (гл. 24):



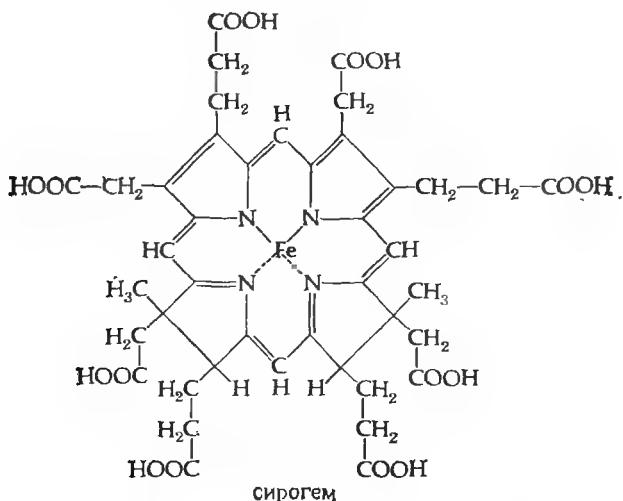
с образованием продукта (II), претерпевающего различные превращения. У некоторых водорослей, например *Chlorella*, продукт II

восстанавливается неизвестными механизмами до $T \begin{cases} S-SH \\ SH \end{cases}$ и прямо используется для синтеза цистеина (гл. 20). Большинство бактерий, однако, катализирует реакцию (2), в результате образуются неорганический сульфит и окисленный тиоредоксин, который может снова восстанавливаться вышеописанным способом.

Неорганический сульфит ассимилируется посредством восстановления до сульфида S^{2-} , который может использоваться в синтезе цистеина (гл. 20). Это шестизлектронное восстановление катализируется одним ферментом — *сульфитредуктазой*, которая относится к числу наиболее сложных ферментов. Сульфитредуктаза катализирует реакцию, которую можно записать в общем виде следующим образом:

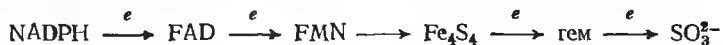


Выделенная из *E. coli* сульфитредуктаза имеет мол. массу 670 000 и субъединичную структуру $\alpha_8\beta_4$. Каждый α -димер содержит один FAD и один FMN, тогда как каждая β -цепь содержит одну (Fe_4S_4) -группу и одну молекулу *сирогема*, структура которого показана ниже:



Сирогем — это железотетрагидропорфирин типа изобактериохлорина; два соседних пиррольных кольца полностью восстановлены, и каждый пиррол содержит один остаток пропионовой и один остаток уксусной кислоты в боковых цепях; следовательно, сирогем — производное урпорфирина (гл. 22).

Перенос электронов происходит в соответствии со следующей линейной последовательностью:

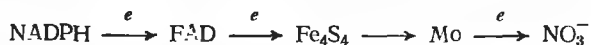


NADPH передает пару электронов к FAD, от которого она быстро переносится к FMN. Если только 1 моль NADPH в расчете на 1 моль гема добавляется к ферменту, образуется стабильная форма $\text{FAD-FMNH}\cdot\text{-Fe}_4\text{S}_4\text{-гем-Fe}^{2+}$. В присутствии избытка NADPH все компоненты полностью восстанавливаются. Гем, который медленно самоокисляется и может также связывать CO, и есть центр связывания для SO_3^{2-} . Никакой промежуточной восстановленной формы серы не появляется, а при окислении 3 экв. NADPH освобождается сразу S^{2-} . Это довольно медленный процесс, скорость которого составляет 6 об/с. Фермент может медленно восстанавливать нитрит, однако это не его функция; в клетке имеется другая система для осуществления этого процесса.

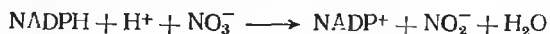
13.5.3. Восстановление нитрата

Различные бактерии могут образовывать ATP при переносе электронов по цепи переносчиков, оканчивающейся NO_3^- , а не O_2 . Большинство анаэробов, факультативных аэробов, водорослей и растений восстанавливает NO_3^- до NH_3 в количествах, которые необходимы для синтезов аминокислот, пуринов и пиримидинов. Это осуществляется посредством последовательного действия *нитрат- и нитритредуктаз*.

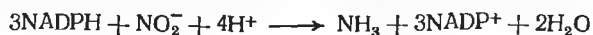
Нитратредуктаза (мол. масса 800 000) — тетрамер, составленный из двух димеров, включающих по одной субъединице с мол. массой 150 000 и по одной — с мол. массой 50 000. Фермент содержит один атом молибдена, один FAD и несколько (Fe_4S_4)-групп в расчете на димер. Путь электронов можно представить следующим образом:



и катализируемая реакция такова:



Нитритредуктаза катализирует шестиелектронное восстановление NO_2^- до NH_3 , используя NADPH в качестве восстановителя. Простетическая группа фермента из *Neurospora* включает FAD и сирогем. В нитритредуктазе из шпината имеется (Fe_2S_2)-центр. Вероятно, путь электронов здесь такой же, как и в сульфитредуктазе. Суммарная реакция выглядит следующим образом:



Железо сирогема представляет собой центр связывания для NO_2^- . До момента появления NH_3 никакие промежуточные продукты не обнаруживаются.

Нитрогеназа — фермент, ответственный за фиксацию азота, т. е. за восстановление атмосферного азота N_2 до NH_3 . Этот процесс осуществляется только облигатно анаэробными почвенными бактериями (*Klebsiella*, *Clostridium*), некоторыми аэробами, например *Azotobacter*, а также «бактероидами» *Rhizobium*, которые развиваются в корневой системе растений из семейства бобовых, и синезелеными водорослями. Около 175 млн. т N_2 фиксируется ежегодно в мире благодаря этому процессу. Шестиэлектронное восстановление осуществляется посредством совместного функционирования двух белков. Большой компонент (мол. масса 220 000) состоит из четырех идентичных полипептидных цепей, каждая из которых содержит (Fe_4S_4) -группу, и относительно небольшого полипептида, содержащего (FeS) -группу и два атома молибдена. Меньший компонент (мол. масса 55 000) — димер из идентичных субъединиц, каждая из которых содержит (Fe_4S_4) -группу. Последняя при восстановлении дает характерный сигнал ЭПР ($g=1,94$), тогда как железосерогруппы большего компонента не обладают такой способностью. В комплексе на каждый большой компонент приходится по два меньших.

Необходимые для процесса восстановительные эквиваленты поставляются от NADPH через флавопротенд к растворимому ферредоксину. Ферредоксин восстанавливает меньший железопротенд, который в свою очередь восстанавливает железомолибдопротенд. Хотя E'_0 ферредоксина достаточно низок, что в принципе делает возможным восстановление атмосферного азота, для осуществления указанного процесса все же требуется АТР. Меньший железопротенд связывает два АТР на один Fe, в результате чего E'_0 снижается на 100 мВ и обеспечивается возможность восстановления железомолибдопротенда. АТР гидролизует, только если присутствуют оба компонента сразу; на каждую пару электронов, переносимых от железопротенда к железомолибдопротенду, гидролизуются четыре АТР.



Механизм, посредством которого утилизируется АТР, неизвестен. Фермент не обладает абсолютной специфичностью к азоту; его способность восстанавливать ацетилен до этилена легла в основу разработки полезного экспериментального критерия специфичности. В отсутствие N_2 или ацетилена комплекс функционирует как АТР-зависимая гидрогеназа. В действительности даже в присутствии $\text{N}_2 \sim 1/3$ всего потока электронов и соответственно такая же доля потребляемого АТР переправляется на образование H_2 , что

и приводит к большой потере энергии. Оба компонента фермента быстро и необратимо отравляются O_2 . В этой связи было выдвинуто предположение, что основной функцией *леггемоглобина* из *Rhizobium* может быть связывание O_2 для поддержания его эффективной концентрации ниже 0,01 мм рт. ст. Вероятно, стенка гетероцисты хорошо отделяет нитрогеназу сине-зеленых водорослей от кислорода, продуцируемого в процессе их фотосинтетической активности.

13.6. Оксидазы, оксигеназы и гидроксилазы

Хотя электронный перенос в организованной митохондриальной системе, сохраняющей энергию путем образования АТР, отвечает за большую долю использованного кислорода, имеются многочисленные ферменты, которые катализируют прямые реакции между своими субстратами и O_2 . Вклад таких реакций в общее потребление кислорода в организмах млекопитающих сравнительно невелик. Эти реакции могут быть включены в различные пути биосинтеза и распада, особенно в метаболизме ароматических соединений и стероидов. Очень интересный набор ферментов такого типа имеется у бактерий, как, например, в виде индуцированных ферментов у *Pseudomonas*; эта бактерия образует большие количества таких ферментов, когда выращивается на различных ароматических соединениях как единственном источнике углерода. Здесь представлен лишь общий обзор ферментов, относящихся к указанным категориям.

13.6.1. Флавопротеидные оксидазы

Одна категория этих оксидаз уже описана ранее; это простые самоокисляющиеся флавопротеиды, например ν - и ι -оксидазы аминокислот из печени, почек и змеиных ядов (разд. 13.2). Они восстанавливают O_2 до H_2O_2 , который может либо разлагаться каталазой, либо использоваться в реакциях, катализируемых пероксидазой (разд. 13.7.6).

13.6.2. Флавожелезопротеиды, содержащие молибден

Молибден в форме Mo^{6+} присутствует в активных центрах небольшого числа ферментов, которые выполняют совершенно различные физиологические функции. Весьма близки между собой ксантиндегидрогеназы печени животных и различных бактерий и грибов, ксантиноксидаза молока и альдегидоксидаза печени. Все эти ферменты представляют собой димеры с идентичными субъединицами (мол. масса 150 000), каждая из которых содержит

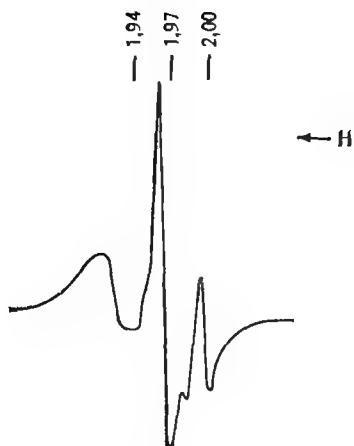
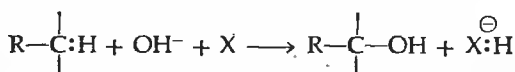


Рис. 13.16. Спектр ЭПР восстановленной альдегидоксидазы из печени кролика. Кривая регистрирует первое производное истинного сигнала. Сигналы при значениях g , равных 2,0, 1,97 и 1,94, принадлежат свободному радикалу (предположительно $\text{FADH}\cdot$), Mo^{5+} и железосерокомплексу соответственно.

один Mo^{6+} , один FAD и либо один (Fe_4S_4) -центр, либо два (Fe_2S_2) -центра. Каждая субъединица катализирует гидроксирование атома углерода в гетероциклической системе ароматических колец, например превращение гипоксантина в ксантин или N-метилникотинамида в его пиридон, и обе катализируют окисление альдегидов до соответствующих кислот. На молибдене происходит атака на субстрат, сопровождающаяся отщеплением гидрид-иона. Гидрид-ион замещается ионом гидроксида из среды



так что кислород введенного гидроксила происходит из воды, а не из O_2 .

Способ присоединения Mo^{6+} к белку неизвестен, но существуют данные, свидетельствующие о наличии в его окружении персульфидных групп ($-\text{S}-\text{S}-$) (X в вышеприведенном уравнении реакции) и о том, что гидрид-ион каким-то образом поделен между ними. Электроны от восстановленной молибден-персульфидной структуры переносятся к FAD, который в свою очередь находится в контакте как с молибденом, так и с железосероцентром, так что окисленный фермент может принимать 5 или 6 электронов. На рисунке 13.16 показан спектр ЭПР восстановленной альдегидоксидазы из печени кролика и видны сигналы, относящиеся к Mo^{5+} , $\text{FADH}\cdot$, и $(\text{Fe}^{3+})\text{S}-(\text{Fe}^{2+})_3\text{S}_3$. Ксантиндегидрогеназа дает синий семихинон и восстанавливает O_2 только по одноэлектронному механизму. Однако в условиях мягкой денатурации восстановленная форма фермента вместо этого образует FADH_2 , а затем

легко восстанавливает O_2 до H_2O_2 . Растворимая ксантиноксидаза молока и альдегидоксидаза печени действуют сходным образом. Напротив, ксантиноксидаза липидов молока ведет себя скорее как печеночная ксантиндегидрогеназа и легко восстанавливает NAD^+ .

13.6.3. Медьсодержащие оксидазы

Некоторые окрашенные в синий цвет ферменты, имеющие в большинстве растительное происхождение и содержащие медь в качестве единственной простетической группы катализируют простое дегидрирование субстрата. Медьсодержащие оксидазы наиболее распространены в тканях млекопитающих (табл. 13.7), но вместе с тем к этой группе ферментов относятся и такие, как *аскорбатоксидаза* тыквы и *лакказа*, впервые обнаруженная в лаковом дере-

Таблица 13.7

Некоторые медьсодержащие оксидазы

Оксидаза	Продукт восстановления O_2	Молекулярная масса	Число атомов Cu на одну молекулу	Источник
Аскорбатоксидаза	H_2O	135 000	8—10	Тыква
Лакказа	H_2O	110 000	4—6	Лаковое дерево
Церулоплазмин	H_2O	150 000	6—8	Человеческая сыворотка
Уратоксидаза	H_2O	120 000	1	Печень
Диаминоксидаза	H_2O_2	185 000	2	Почки свиньи
Моноаминоксидаза	H_2O_2	1 200 000	8	Печень свиньи
Галактозооксидаза	H_2O_2	60 000	1	Грибы

ве, а по современным данным широко распространенная в растениях и грибах. Лакказа катализирует двуэлектронное окисление *о*- и *п*-диоксибензолов до соответствующих хинонов, восстанавливая при этом O_2 до H_2O . Аскорбатоксидаза окисляет аскорбат до дегидроаскорбата (разд. 13.6.7) опять-таки с восстановлением O_2 до H_2O . Плазма крови содержит белок *церулоплазмин* небесно-голубого цвета, который сходным образом катализирует окисление гидрохинона и *п*-фенилендиамина до *п*-хинона. Все эти ферменты обесцвечиваются своими субстратами и ингибируются CN^- . Судя по данным ЭПР-спектроскопии, медь в каждом из них связывается тремя разными способами, включая образование Cu^{2+} — Cu^{2+} -пары с сопряженными спинами, которая не обнаруживается методом ЭПР. Механизм действия ферментов этой

группы до сих пор неясен. O_2 должен, очевидно, связываться либо с одиночной Cu^+ , либо с парой Cu^+ . Субстраты отдают один электрон с образованием свободно-радикальных промежуточных продуктов. Обнаружена по крайней мере одна промежуточная стадия, когда кислородный радикал, вероятно O_2^- , связан с парой Cu^+ . Показано, что H_2O , связанная с медью в молекуле окисленного фермента, может обмениваться с H_2O из среды лишь после перехода фермента в восстановленную форму. В ходе реакции H_2O_2 не появляется; таким образом, эти ферменты, подобно цитохром-оксидазе, осуществляют четырехэлектронное восстановление атмосферного кислорода.

Вторая группа — это бесцветные медьсодержащие оксидазы, медь которых связана иначе, чем в «голубых» белках; они восстанавливают O_2 до H_2O_2 . В плесневых грибах, растениях, плазме крови найдены *диаминоксидазы*, которые в качестве субстратсвязывающего центра содержат пиридоксальфосфат (гл. 21); он образует шиффово основание с одной аминогруппой субстрата, тогда как другая аминогруппа окисляется до альдегида с выделением NH_3 . В печени свиньи имеется *моноаминоксидаза*, которая не содержит пиридоксальфосфата и окисляет разнообразные моноамины. Гриб *Polysporus circinatus* содержит галактозооксидазу, окисляющую галактозу при атоме С-6 с образованием галактозоальдегида; Cu^{2+} скоординирован с двумя имидазольными группами. Все вышеуказанные медьсодержащие ферменты инактивируются специфическими связывающими медь реагентами, например диэтилдитиокарбаматом.

13.6.4. Диоксигеназы

Ферменты, катализирующие реакции, в которых оба атома молекулярного кислорода встраиваются в продукты реакции, называются *диоксигеназами*. Известные в настоящее время ферменты этой группы могут содержать в качестве активной группы гем или негемовое железо, а для действия некоторых, кроме того, необходим α -кетоглутарат. Чаще всего диоксигеназы катализируют разрыв двойной связи в ароматическом кольце, однако и другие разнообразные реакции катализируются сходным образом.

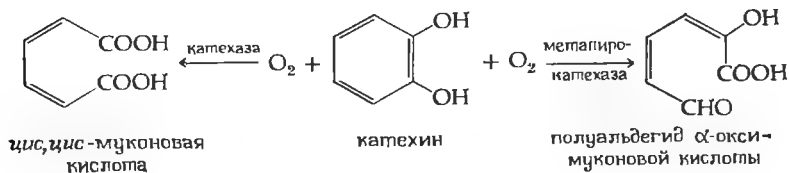
13.6.4.1. Гемсодержащие диоксигеназы

Печень, а также клетки *Pseudomonas* содержат гемопротеид, который катализирует начальную стадию катаболизма триптофана, разрыв индольного кольца с образованием формил- γ -кинуренина (гл. 23). Один атом кислорода входит в формильную группу; другой образует кетогруппу. Для катализа требуется, чтобы в гемовом железе присутствовал Fe^{2+} . Фермент медленно самоокисля-

ется и восстанавливается анионом супероксида (O_2^-). Родственный ему фермент — *индолиламиндиоксидаза* кишечника, который может оксигенировать индолиламины, например D-триптофан, серотонин и триптамин, не использует O_2 , но требует анион супероксида, который восстанавливает железо и является активным оксигенирующим началом.

13.6.4.2. Железосодержащие диоксигеназы

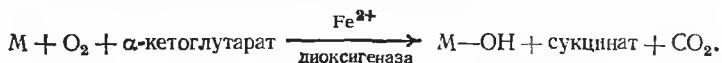
По крайней мере три четверти известных диоксигеназ содержат негеминное железо. Красные ферменты, полученные из различных псевдомонад, которые могут катализировать интрадиольную оксигенацию, содержат Fe^{3+} . Типичной в этом отношении является *пирокатехаза*. Бесцветные экстрадиольные оксигеназы, например *метапирокатехаза*, содержат Fe^{2+} , связанный с —SH-группой.



Гомогентизатоксигеназа печени (гл. 23) относится ко второй категории ферментов, нуждающихся в железе. Этот фермент легко теряет железо при очистке, но полная активность восстанавливается при добавлении Fe^{2+} . Железосодержащие ферменты также катализируют оксигенирование сульфгидрильных соединений. Ферменты печени, которые окисляют цистеамин и цистеин до гипотаурина и цистеинсульфиновой кислоты (гл. 23), содержат железо и, по-видимому, проявляют потребность в сульфиде.

Метаболизм тирозина (гл. 23) включает реакцию, в ходе которой *n*-оксифенилпировиноградная кислота превращается в гомогентизиновую кислоту под действием единственного фермента. Этот процесс включает миграцию группы $-CH_2COOH$ из *para*- в *meta*-положение относительно исходной гидроксидной группы (гл. 23). Активный фермент обнаружен только в печени и почках. Фермент представляет собой тетрамер из идентичных субъединиц, и его активность определяется присутствием Fe^{2+} . Когда для исследований метаболизма тирозина используется $^{18}O_2$, один меченый атом кислорода появляется во вновь образованной *n*-фенольной группе, а второй — во вновь образованной карбоксильной группе. Механизм необычного перемещения боковой цепи требует выяснения.

Железо- α -кетоглутаратдиоксигеназы. Некоторые железозависимые ферменты катализируют гидроксилирование субстрата в ходе процесса, в котором α -кетоглутарат подвергается окислительному декарбоксилированию до сукцината. Один из двух атомов кислорода от молекулы O_2 появляется в новой гидроксидной группе субстрата, а другой — в одном из кислородных атомов новой карбоксильной группы сукцината. В тканях животных эта группа ферментов включает те ферменты, которые гидроксилируют положение 4 остатков пролина и положение 5 некоторых лизиновых остатков в проколлагене (гл. 38) и которые превращают γ -бутиробетанин в карнитин (гл. 22). Аскорбат служит в качестве восстановительного агента для поддержания железа в ферменте в двухвалентном состоянии. Проллил- и лизилоксигеназы могут гидроксилировать свои субстраты только тогда, когда они находятся в типичных аминокислотных последовательностях проколлагена. Процесс в целом может быть изображен как



Распространение этого класса ферментов подвергалось систематическому исследованию. Примечательно, что как *Neurospora crassa*, так и *Rhodotorula* содержат ферменты, которые используют этот механизм для гидроксилирования метильной группы тимина с образованием 5-оксиметилурацила и, что наиболее удивительно, для гидроксилирования 2'-углерода дезоксирибозы как тимидина, так и дезоксиуридина.

В табл. 13.8 обобщена информация о некоторых диоксигеназах, которые обсуждались выше.

13.6.5. Монооксигеназы

Живые организмы содержат группу многочисленных и разнообразных ферментов, получивших общее название *монооксигеназ*. В типичном случае один атом кислородной молекулы обнаруживается в новой гидроксидной группе субстрата, другой — восстанавливается до воды в процессе реакции. В соответствии с этим реакция должна протекать при участии фермента, субстрата, O_2 и какого-либо восстанавливающего агента. В литературе такие ферменты раньше назывались гидроксилазами или оксидазами со смешанными функциями.

13.6.5.1. Медьсодержащие монооксигеназы

Допамин- β -монооксигеназа, присутствующая в мозге и в хроматинной ткани, катализирует гидроксилирование 3,4-диоксифенилэтиламина до норадреналина (гл. 45). Димеры идентичных мо-

Таблица 13.8

Некоторые диоксигеназы

Субстрат	Продукт	Молекулярная масса	Простетическая группа	Источник
L-Триптофан	Формил-L-кинуренин	167 000	Gem	Печень крысы
L-Триптофан	Формил-L-кинуренин	120 000	Gem	Кишечник кролика
Катехин	цис,цис-Муконовая кислота	90 000	2Fe ³⁺	<i>Pseudomonas</i>
Протокатеховая кислота	β -Карбоксимуконовая кислота	700 000	8Fe ³⁺	»
Катехин	Полуальдегид α -оксимуконвой кислоты	140 000	4Fe ²⁺	»
Гомогентизиновая кислота	Малеилцетонацетат	380 000	nFe ²⁺	Печень
Цистамин	Гипотаурин	83 000	2Fe ³⁺	»
Ненасыщенные жирные кислоты	Пероксиды жирных кислот	102 000	Fe ²⁺	Соевые бобы
n-Окисфенилпириновинградная кислота	Гомогентизиновая кислота	100 000	2Fe ²⁺	Печень человека
-X-Pro-Gly-	-X-HuPro-Gly-	(110 000) _n	Fe ²⁺ , α -кетоглутарат	Кожа новорожденных
-X-Lys-Gly-	-X-HuLys-Gly-	200 000	Fe ²⁺ , α -кетоглутарат	Куриный эмбрион
γ -Бутиробутанн	Карнитин		Fe ²⁺ , α -кетоглутарат	Печень
Тимин	5-Оксиурацил		Fe ²⁺ , α -кетоглутарат	<i>Neurospora crassa</i>

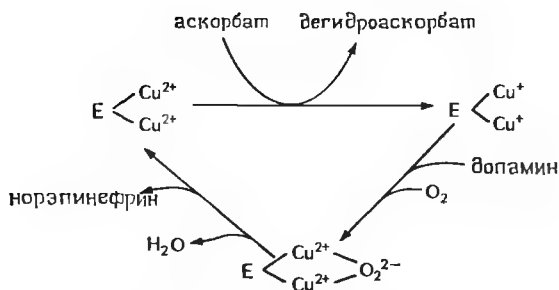


Рис. 13.17. Роль аскорбата в каталитическом цикле допамин — монооксигеназа.

номеров (мол. масса 75 000) фермента образуются при участии дисульфидных мостиков, а два таких димера, связываясь нековалентно, образуют тетрамер. Каждый мономер, по-видимому, содержит один атом Cu, который восстанавливается аскорбатом, а затем окисляется, как показано на рис. 13.17.

13.6.5.2. Фенолмонооксигеназы (фенолаза, тирозиназа, крезолоза)

Эти ферменты имеются у бактерий, растений, насекомых, а также в печени и коже млекопитающих. Механизм катализируемых этими ферментами реакций, по существу, сходен с механизмом действия допамин-оксигеназы, но отличается одной уникальной особенностью: промежуточный продукт, *o*-оксисбензол, служит в качестве восстановителя для Cu²⁺ во втором цикле, что сопровождается образованием *o*-хинона. Полимеризация *o*-хинона лежит в основе образования меланина.

13.6.5.3. Флавопротейдные монооксигеназы

Это самая обширная группа монооксигеназ. Действие многих ферментов этой группы, по-видимому, включает последовательные стадии, в которых восстановитель переводит флавин в дигидроформу, восстанавливающую O₂ до H₂O₂, а затем фермент-флавинпероксидный комплекс гидроксилирует субстрат.

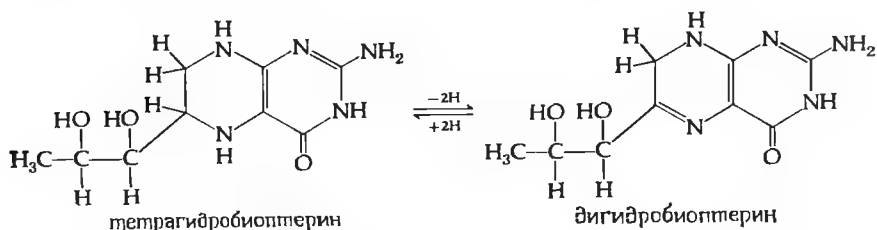
В очень маленьком подклассе этих ферментов, обнаруженных только в бактериях, субстрат, который оксигенируется, одновременно и восстанавливает фермент. Первой из этого подкласса стала известна лактат — монооксигеназа из *Mycobacterium*. В этом случае лактат восстанавливает FMN фермента (мол. масса 300 000), окисляясь до пирувата. Последний не отделяется от фермента, но в присутствии O₂ окисляется до ацетата и CO₂. Если используется ¹⁸O₂, то один атом кислорода находят в карбоксильной группе

ацетата, а другой — в молекуле воды. Лизин- и аргинин — монооксигеназы имеют сходные механизмы действия.

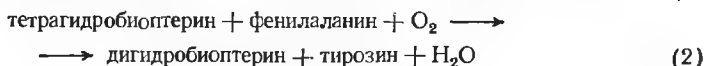
Большинство флавопротенидных монооксигеназ функционируют с внешним восстановителем: либо с NADH, либо с NADPH. Последовательность реакций, по-видимому, включает восстановление флавина за счет NADH и аутоокисление восстановленного флавина с образованием флавинпероксидного комплекса, который затем гидроксилирует субстрат, например салицилат, с образованием катехина и CO_2 . Удивительная особенность этих ферментов состоит в том, что субстрат, который должен гидроксилироваться, является мощным положительным эффектором для восстановления флавина пиридиннуклеотидом, т. е. реакции, которая протекает с меньшей скоростью в отсутствие субстрата. Благодаря этому устройству фермент функционирует только в том случае, если имеется в наличии субстрат, который предстоит окисгенировать, и поэтому не происходит бесцельного окисления NADH или NADPH. Среди нескольких таких ферментов, обнаруженных у млекопитающих, интерес представляет микросомальный фермент, который гидроксилирует N-метиланилин на атоме N.

13.6.5.4. Монооксигеназы, использующие птерин

В реакциях, катализируемых небольшой группой монооксигеназ, роль флавиннуклеотида принимает на себя *тетрагидробиоптерин*, образующийся в результате восстановления дигидробиоптерина за счет NADPH.



Тетрагидробиоптерин — восстановитель для молекулярного кислорода в процессах встраивания кислорода в молекулы таких субстратов, как фенилаланин, тирозин и триптофан (в печени). Фенилаланин-монооксигеназа печени не может катализировать восстановление дигидробиоптерина; эта реакция катализируется особым ферментом — дигидробиоптеринредуктазой.

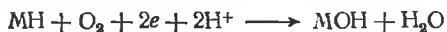


В отличие от восстановленных флавиннуклеотидов тетрагидробиоптерин самопроизвольно очень медленно реагирует с O_2 , так что скорость образования функционально активной H_2O_2 должна была бы ограничивать процесс, если бы не присутствие Fe^{3+} в белке. (Флавопротейдные монооксигеназы не содержат ионов железа.) Для того чтобы скорость катализируемой фенилаланин — монооксигеназой реакции была близка к V_{max} , требуется присутствие лизофосфатидилхолина. Фермент, по-видимому, фосфорилирован; дефосфорилированная форма относительно неактивна. Сходными характеристиками отличаются механизмы действия других утилизирующих птерин ферментов.

В табл. 13.9 перечислены свойства некоторых монооксигеназ.

13.6.6. Реакции введения одного атома кислорода, катализируемые цитохромом P_{450}

В имеющем широкое распространение механизме гидроксирования путем введения одного атома кислорода функциональный атом железа находится в гемовой группе аутооксидабельного цитохрома, способного также связывать CO . Из-за необычного максимума поглощения CO -соединения при 450 нм эта группа ферментов была названа *цитохромами P_{450}* . Они обнаруживаются в мембранах печеночной эндоплазматической сети, в митохондриях коры надпочечников, в почечной щеточной кайме и в плазматических мембранах различных бактерий. Катализируемая реакция в принципе такая же, как и у всех других монооксигеназ.



Оксигенированию подвергаются весьма разнообразные продукты метаболизма, в том числе ω - CH_3 -группы какого-либо алкана или жирной кислоты, углеродные атомы кольца стероидов или камфоры, полициклические ароматические ядра бензопирена или метилхолантрена, фенобарбитал или N-алкильные заместители у различных вторичных или третичных аминов.

Цитохромы P_{450} из печени относятся к числу *индуцируемых* ферментов; это означает, что количество присутствующего фермента может увеличиваться в 25 раз при введении одного из многочисленных чужеродных соединений, например фенобарбитала, метилхолантрена или ДДТ. Субстратная специфичность печеночного цитохрома P_{450} неясна, так как неизвестно, сколько отдельных ферментов он включает. Фенобарбитал индуцирует три иммунологически различаемых цитохрома P_{450} (мол. масса 48 000), из которых для одного известна полная последовательность, тогда как метилхолантрен индуцирует один цитохром P_{448} (мол. масса 53 000). Су-

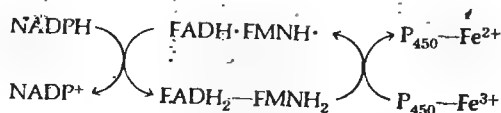
Таблица 13.9
Некоторые монооксигеназы

Субстрат	Продукт	Молекулярная масса	Простетическая группа	Источник
Допамин	Норэпинефрин	300 000	Cu	Хром-аффинная ткань
Фенолы	o-Дифенолы и o-хиноны	125 000	Cu	Грибы
Лактат	Ацетат + CO ₂	300 000	FMN	<i>Mycobacterium</i>
Лизин	δ-Аминовалерамид	240 000	FAD	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Аргинин	γ-Гуанидинбутирамид		FAD	<i>Streptomyces griseus</i>
Салицилат (NADH)	Катехин + CO ₂	91 000	FAD	Почвенная бактерия
l-Оксибензоат (NADPH)	3,4-Оксибензоат	90 000	FAD	<i>Pseudomonas putida</i>
Фенол (NADPH)	Катехин	150 000	FAD	<i>Trichosporon cutaneum</i>
N-Метиланилин	N-метилфенилгидроксилламин	500 000	FAD	Микросомы печени свиньи
L-Кинуренин	3-Окси-L-кинуренин		FAD	Митохондрии крысы
L-Фенилаланин	L-Тирозин	100 000	Fe ³⁺ ; биоптерин	Печень
L-Тирозин	L-Допа		Fe ³⁺ ; биоптерин	Хром-аффинная ткань
L-Триптофан	5-Окситриптофан	30 000	Fe ³⁺ ; биоптерин	Печень, шишковидная железа

существует по крайней мере три четко выраженных печеночных фермента, которые катализируют гидроксирование стероида $3\alpha,17\beta$ -дезокси-5-андростана, а именно в положениях 2α и 18 , в положениях 12β , 15α и 16α и в положении 15β $3,17$ -дисульфатного эфира этого стероида. Эти гидроксилирующие ферменты сообщают обезвреживают различные чужеродные соединения, а также лимитируют время, в течение которого могут сохранять свою активность различные наркотики. Не все соединения, играющие роль субстратов, являются эффективными индукторами. Лечение некоторых форм острой интоксикации может быть облегчено введением индуктора, который в этом случае вообще безвреден. На практике для этой цели применяли ДДТ.

Свойства этих ферментов могут сильно меняться при извлечении их из липидной среды, при этом они часто переходят в форму, полоса Соре которой смещена с 450 до 420 нм. Поэтому большинство экспериментов по изучению цитохромов P_{450} проводят с микросомальными препаратами. Спектр поглощения цитохромов P_{450} соответствует таковому для цитохрома b -типа. Спектр ЭПР указывает на то, что пятым лигандом для гемового железа может быть цистеиновая сера.

Восстановителем, который необходим для функционирования этих ферментов, служит микросомальный флавопротеид — *цитохром P_{450} — редуктаза* (молекулярная масса 78 000), образование которого индуцируется теми же агентами. Этот фермент богат гидрофобными остатками, что согласуется с его расположением в мембране. В очищенном виде он хорошо функционирует только при добавлении фосфатидилхолина. В одной молекуле фермента содержится один FAD и один FMN; фермент катализирует перенос электронов от NADPH к цитохрому P_{450} . Каталитический цикл, по-видимому, таков:



E_0 для флавопротеида в этом цикле составляет —370 мВ.

Цитохромы P_{450} коры надпочечников находятся в митохондриальной мембране, где два отдельных фермента катализируют соответственно расщепление боковой цепи холестерина до прегненолона (гл. 44) и реакции гидроксирования различных стероидов в положении 11β . Индуктор этих ферментов — адренокортикотропный гормон (гл. 48), который, кроме того, индуцирует образование небольшого белка, по-видимому связывающего стероиды и приводящего их в эффективный контакт с активным центром цитохрома P_{450} . *Холестериндесмолаза* получена в форме чистого белка (молекулярная масса 78 000).

масса 60 000) с одним гемом; она образует 4-, 8- и 16-членные полимеры, из которых только один обнаруживает ферментативную активность. Оба фермента из надпочечников обладают отчетливым спектром ЭПР. Высокоспиновые формы представляют собой ферменты в состоянии Fe^{3+} , а низкоспиновые формы — комплексы фермента с субстратом. 11 β -Оксигеназа ($E'_0 = -400$ мВ), характеризуется значением $g=7,9$. Для фермента, расщепляющего холестерин, $g=8,2$, а $E'_0 = -320$ мВ.

Оба фермента надпочечников получают электроны не от флавопротеида, а от железосеропротеида адренодоксина (разд. 13.2.1), для которого $E'_0 = -270$ мВ. В свою очередь последний восстанавливается специфичной NADPH-зависимой адренодоксинредуктазой (мол. масса 54 000) с $E'_0 = -275$ мВ, которая содержит один FAD на молекулу.

Многое для понимания природы и функций таких ферментов дало изучение системы, которая оксигенирует камфору до экзо-5-ОН-камфоры в клетках *Pseudomonas putida*. Компоненты этой системы очень удобны для исследования, так как представляют собой водорастворимые цитоплазматические ферменты. В других отношениях указанная система напоминает систему надпочечников, так как состоит из цитохрома P_{450} (мол. масса 45 000, $E'_0 = -380$ мВ), (Fe_2S_2)-протеида, *путидаредоксина* (мол. масса 12 500, $E'_0 = -196$ мВ), для которого известна полная аминокислотная последовательность, и NADPH-зависимой содержащей FAD редуктазы (мол. масса 43 500, $E'_0 = -285$ мВ).

Прямое восстановление цитохрома P_{450} с помощью NADPH представляется маловероятным ввиду неблагоприятного соотношения их потенциалов. Однако цитохром P_{450} быстро связывает камфору на активном центре, в результате чего γ -полоса поглощения смещается от 571 до 646 нм, низкоспиновое железо со значениями g , равными 2,45, 2,26 и 1,91, переходит в высокоспиновое ($g=8,4$ и 1,8), а E'_0 увеличивается до -180 мВ. Химическое восстановление этого комплекса приводит к образованию продукта камфора- $P_{450}\text{-Fe}^{2+}\text{-O}_2$, для которого E'_0 составляет 0 мВ. Цитохром P_{450} образует прочный активный комплекс с путидаредоксином (константа диссоциации 3 мкмоль/л), а последний также прочно связывается в соотношении один к одному с флавопротеидом. Таким образом, электроны легко движутся от NADPH ($E'_0 = -320$ мВ) к комплексу камфора- P_{450} , восстанавливая железо до Fe^{2+} , а затем к относительно стабильному продукту присоединения кислорода — камфора- $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$, что обеспечивает условия для гидроксирования.

Даже сравнительно поверхностные наблюдения указывают на сходство характеристик всех P_{450} -систем. Холестерин не влияет на изолированную *холестериндемолазу* в отличие от того воздействия, которое оказывает камфора на P_{450} из *P. putida*, но вместе

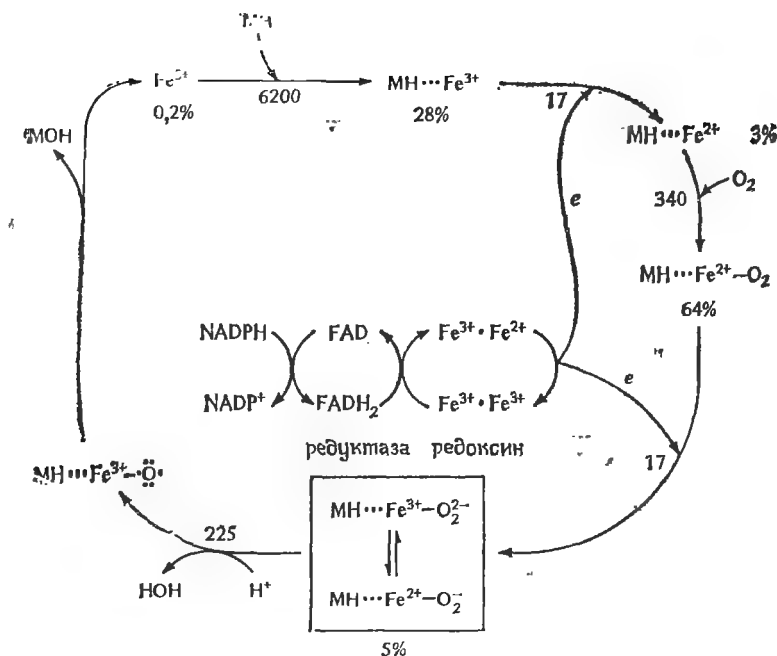


Рис. 13.18. Каталитический цикл встраивания одного атома кислорода при участии цитохрома P₄₅₀. Цифры около стрелок обозначают константы скорости реакции второго порядка. В процентах выражена молярная доля каждого компонента от суммы всех участвующих в процессе веществ (в стационарном состоянии).

с тем стероид влияет аналогичным образом на поведение комплекса флавопротеин-аденодоксин-P₄₅₀; аденодоксин и P₄₅₀ образуют комплекс, для которого константа диссоциации составляет $<10^{-9}$. Как в системе надпочечников, так и в системе *Pseudomonas* относительно медленный перенос электронов от железосероцентра к гему — стадия, лимитирующая скорость процесса.

Предполагаемый механизм самого гидроксирования изображен на рис. 13.18. Две восстановительные стадии лимитируют скорость; все остальные стадии происходят по крайней мере в 100 раз быстрее.

Описаны и другие типы систем бактериальных монооксигеназ, например система, в которой рубредоксин заменяет железосеропротеид ферредоксинового типа и восстанавливает простой железопротейд, а также системы, в которых железосеропротеид, по-видимому, сам является монооксигеназой; но такие системы редки.

13.6.7. Гем-оксигеназа

Фермент, который превращает гем в биливердин (гл. 32), гем-оксигеназа, находится в эндоплазматической сети клеток печени и селезенки и, очевидно, в связи с этим до сих пор не был выделен в форме водорастворимого, активного фермента. Количество фермента увеличивается в 10—25 раз после введения металлов с переменной валентностью, особенно Co^{2+} . Фермент уникален в том смысле, что остаток гема, расположенный на его поверхности, катализирует реакцию своего собственного монооксигенирования. Восстановительные эквиваленты поставляются либо NADH , либо NADPH через флавопротеидредуктазу, которая восстанавливает железо до Fe^{2+} . Фермент, по-видимому, не имеет никакой другой протетической группы. Кислород, связанный с Fe^{2+} , вероятно, активируется, как в цитохроме P_{450} . По всей вероятности, боковые гидрофобные цепи таким образом ориентируют плоскость гема в гидрофобной щели белка, что обеспечивают возможность встраивания одного атома кислорода в углеродный мостик между I и II кольцами порфирина, в то время как другой атом кислорода восстанавливается до H_2O . Последующее присоединение воды приводит к возникновению нестабильной структуры, от которой отщепляется мостиковый углерод в форме монооксида углерода, в результате чего образуется биливердин.

13.6.7.1. Цитохром b_5

Первая, обнаруженная в микросомах электронпереносящая система — это система восстановления цитохрома b_5 за счет NADH ; биологическая роль этой системы остается неизвестной. Цитохром b_5 восстанавливается *NADH -цитохром b_5 — редуктазой*, содержащей на молекулу ($E'_0 = -280$ мВ) один FAD, который совершает циклические переходы между полностью восстановленной и окисленной формами. Цитохром b_5 (мол. масса 11 000) прочно связан с эндоплазматической сетью своей обширной гидрофобной областью. Редуктаза также сравнительно гидрофобна. Хотя наружная поверхность области цитохрома b_5 , где находится гем, гидрофильна, она лежит в глубокой гидрофобной щели, причем карбоксильные группы пропионовой кислоты ориентированы наружу. Добавление очищенного цитохрома b_5 к микросомам приводит к его связыванию в количестве, в 10 раз превышающем нормальную концентрацию. В мембране существует почти десятикратный избыток этого цитохрома по сравнению с концентрацией редуктазы, так что для их взаимодействия требуется перемещение редуктазы. Восстановленный цитохром b_5 медленно самоокисляется с образованием супероксидного анiona. Этот механизм может быть основным генератором суперпероксида в клетках печени.

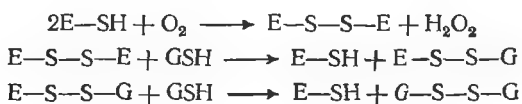
13.7. Другие переносчики электронов

13.7.1. Убихинон

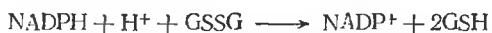
В митохондриях присутствует группа родственных хинонов, которые восстанавливаются, когда митохондрии инкубируются анаэробно с различными субстратами. До установления структуры этих хинонов они назывались просто коферментами Q. Структура этого типа соединений приведена ранее (разд. 12.4), а их роль в транспорте электронов обсуждалась в разд. 12.4.1.

13.7.2. Глутатион

Глутатион, γ-глутамилцистеинилглицин (GSH), встречается во всех животных тканях. Поскольку свободный цистеин присутствует только в незначительных количествах, то глутатион представляет собой самое распространенное сульфгидрильное соединение в клетках, и, по-видимому, его функция заключается в поддержании в активной конформации многих ферментов. Самопроизвольное окисление этих ферментов может привести к образованию дисульфида. Последовательные реакции обмена дисульфидных групп с глутатионом служат для восстановления активных сульфгидрильных форм (E — фермент).



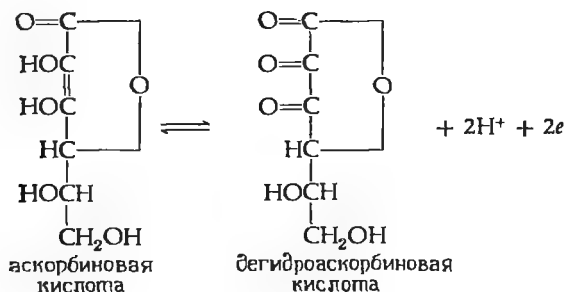
Окисленный глутатион может затем восстановиться широко распространенным флавопротеидом *глутатионредуктазой*, которая утилизует NADPH (разд. 13.2).



13.7.3. Аскорбиновая кислота

Аскорбиновая кислота часто употреблялась в качестве восстановителя в лабораторных экспериментах. Как известно, она требуется для функционирования системы, гидроксилирующей с Fe^{2+} -α-кетоглутаратом (разд. 13.6.4), для таких процессов, как оксигенация допамина (рис. 13.17), и, возможно, для действия системы, восстанавливающей фолат до тетрагидрофолата (гл. 21). При окислении образуется дегидроаскорбиновая кислота; специфици-

ческий восстановитель для этого соединения в животных тканях не известен.

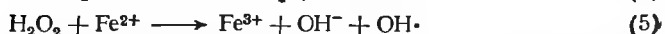
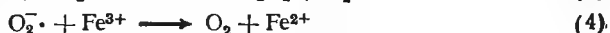
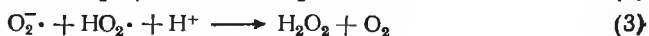


13.7.4. Пероксид и супероксид

Молекулярный кислород O_2 является парамагнитным, потому что он содержит два неспаренных электрона с параллельно ориентированными спинами. Эти неспаренные электроны находятся на разных орбиталях, поскольку два электрона не могут занимать одну и ту же орбиталь, если только их спины не противоположны (антипараллельны). Соответственно восстановление O_2 путем прямого введения пары электронов в его частично заполненные орбитали невозможно без «обращения» спина одного из двух электронов. Ввиду того что такое обращение спина — относительно медленный процесс, O_2 гораздо менее реакционноспособен, чем можно было бы ожидать. Электронно-возбужденные состояния O_2 , который не содержит неспаренные параллельные спины, как, например, синглетные состояния, которые наблюдаются при фотосенсибилизированных окислительных процессах, гораздо более реакционноспособны, чем основное состояние. Если бы не спиновые запреты, сосуществование свободного молекулярного кислорода и органической материи было бы маловероятно.

Спиновый запрет восстановления O_2 может быть преодолен последовательным добавлением одиночных электронов. Поэтому одноэлектронные пути восстановления кислорода, в которых участвуют свободнорадикальные промежуточные продукты, более вероятны, разумеется, при том условии, что они энергетически возможны. Полное восстановление O_2 до $2\text{H}_2\text{O}$ требует 4 электрона; при одноэлектронном восстановлении в качестве промежуточных продуктов возникают супероксид O_2^- , пероксид водорода H_2O_2 и гидроксидный радикал ($\text{OH}\cdot$). Эти продукты очень реакционноспособны, и их присутствие может представлять угрозу для целостности живых систем. На самом деле $\text{OH}\cdot$ — наиболее мутагенный продукт ионизирующей радиации — представляет собой чрезвы-

чайно мощный окислитель, который может атаковать все органические соединения. Одноэлектронное восстановление кислорода инициирует цепь реакций, которые ведут к образованию $\text{OH}\cdot$:

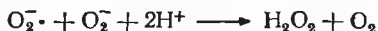


Супероксид-анион, образуемый в реакции (1), может протонироваться до гидропероксидного радикала [реакция (2)], так как HO_2^- — кислота с $pK_a \approx 4,8$. Реакция (3) представляет собой спонтанную дисмутацию, приводящую к образованию $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. Совокупность этих реакций дает основания предполагать, что любая система, продуцирующая $\text{O}_2^- \cdot$, будет также вскоре содержать H_2O_2 . Реакции (4) и (5) указывают на то, что железосодержащие соединения могут катализировать реакцию между $\text{O}_2^- \cdot$ и H_2O_2 , образуя при этом $\text{OH}\cdot$.

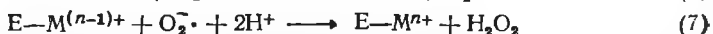
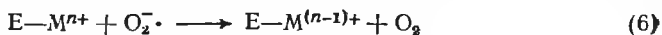
Как уже отмечалось, ксантиноксидаза, альдегидоксидаза и многочисленные флавопротеиды образуют $\text{O}_2^- \cdot$ и H_2O_2 , что происходит и при самопроизвольном окислении гемоглобина, ферредоксина, восстановленных цитохромом b_5 гидрохинонов, тетрагидроптеридинов и адреналина. Митохондрии и хлоропласты образуют $\text{O}_2^- \cdot$ подобно полиморфноядерным лейкоцитам и макрофагам, участвующим в процессе фагоцитоза. Угроза для клеток, возникающая из-за реакционной способности $\text{O}_2^- \cdot$ и H_2O_2 , устраняется действием ферментов, эффективно обезвреживающих эти соединения.

13.7.5. Супероксиддисмутазы

Супероксиддисмутазы катализируют реакцию



Эти ферменты найдены во всех дышащих клетках, а также в различных факультативно анаэробных бактериях. $V_{\max}$ чрезвычайно высока и лимитируется только скоростью диффузии $\text{O}_2^- \cdot$; константа скорости реакции второго порядка составляет $\sim 2 \cdot 10^9$ моль $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$. Супероксиддисмутазы — металлоферменты. Их каталитический цикл включает восстановление и окисление иона металла, например Cu^{2+} , Mn^{3+} или Fe^{3+} , на активном центре (E — фермент, M — металл):



Фермент цитозоля клеток эукариот содержит Zn^{2+} и Cu^{2+} в активном центре в большой близости друг к другу. Фермент состо-

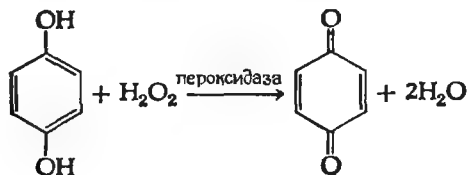
ит из двух идентичных субъединиц (мол. масса 16 000). Структура фермента из бычьих эритроцитов приведена в гл. 6. В каталитическом окислительно-восстановительном цикле функционирует Cu^{2+} ; роль Zn^{2+} неясна.

Супероксиддисмутаза, содержащая Mn^{3+} и состоящая из субъединиц с мол. массой 20 000, найдена в бактериях и митохондриях эукариот. Такие же дисмутазы, содержащие Fe^{3+} , а не Mn^{3+} , обнаружены у некоторых бактерий и сине-зеленых водорослей. Только Cu^{2+} - Zn^{2+} -супероксиддисмутаза ингибируется цианидом. Тогда как цитоплазма и строма хлоропластов листьев шпината содержит Cu^{2+} - Zn^{2+} -фермент, другой, нечувствительный к цианиду фермент тесно связан с продуцирующим O_2 центром и прочно встроен в ламеллу хлоропласта. Последовательности аминокислот Fe^{3+} - и Mn^{3+} -супероксиддисмутаза в значительной степени гомологичны. Cu^{2+} - Zn^{2+} -ферменты, очевидно, представляют собой независимую линию эволюционного развития. Близкое родство бактериальных и митохондриальных супероксиддисмутаза согласуется с теорией происхождения митохондрий из прокариот, которые вступили во внутриклеточный симбиоз с протоэукариотами (гл. 27).

13.7.6. Каталаза и пероксидазы

Каталазная активность наблюдается почти во всех животных клетках и органах. Печень, эритроциты и почки — богатые источники каталаз. Эта активность также обнаруживается во всех растительных материалах и в большинстве микроорганизмов, кроме облигатных анаэробов. В каждом случае каталаза, вероятно, предотвращает аккумуляцию вредного H_2O_2 , образуемого при аэробном окислении восстановленных флавопротеидов и из O_2^- .

Пероксидазы катализируют следующую типичную реакцию:



Каталаза из печени быка (мол. масса 248 000) содержит четыре гемовых группы на молекулу фермента. Ее субъединицы лишены ферментативной активности. Каталаза относится к числу ферментов с наиболее высоким числом оборотов. Одна молекула каталазы может разложить 44 000 молекулы H_2O_2 в секунду. Фактически фермент не требует почти никакой энергии активации, и скорость реакции, по-видимому, полностью определяется диффузией.

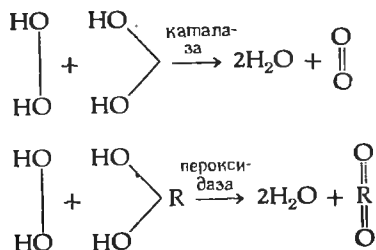
Каталаза реагирует с H_2O_2 с образованием относительно стабильного фермент-субстратного комплекса, структура которого не выяснена. Только в этой форме каталаза может реагировать со своим специфическим ингибитором 3-амино-1,2,4-триазолом.

Хотя *пероксидазы* встречаются относительно редко в животных тканях, в печени и почках обнаружена слабая пероксидазная активность; пероксидаза была выделена из молока. Лейкоциты содержат *вердопероксидазу*, которая ответственна за пероксидазную активность гноя. Клетки фагоцитов содержат *миелопероксидазу*, которая окисляет ионы галогенов, например I^- , до свободного галогена — эффективного бактерицидного агента. В эритроцитах имеется *глутатионпероксидаза*, содержащая Se и специфично окисляющая восстановленный глутатион. Дрожжи и плацента содержат пероксидазы, по-видимому специфичные к ферроцитохрому *c*, и у некоторых бактерий имеются пероксидазы, которые окисляют NADH . Все высшие растения богаты пероксидазами. В исследовании пероксидаз в качестве исходного материала широко применялись хрен и репа.

В опытах по обнаружению скрытой крови в кале, моче и т. д. использовался показатель пероксидазной активности как критерий наличия гемопротендов. Мельчайшие количества крови в присутствии пероксида катализируют окисление бензидина, гваяковой смолы и других веществ до окрашенных продуктов.

Возможно, наиболее эффективное использование пероксидаз происходит у жука бомбардира, который накапливает концентрированный раствор диоксифенола в ~25%-ном H_2O_2 в одной железе и суспензию кристаллической пероксидазы — в другой. Когда на жука нападают, он выбрасывает содержимое этих желез через напоминающую башенку трубку-смерситель. Взаимодействие настолько интенсивно, что жидкие продукты реакции имеют температуру 100°C .

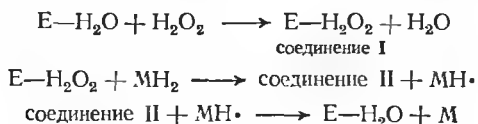
Каталазную и пероксидазную реакции можно записать следующим образом:



Тогда становится очевидной аналогия между этими двумя реакциями. В этом смысле каталазное расщепление H_2O_2 на H_2O и O_2 представляет собой особый случай пероксидазной реакции, когда

пероксид водорода служит в качестве и субстрата, и акцептора. Эта аналогия становится более отчетливой, если учесть, что при высоких концентрациях спиртов с низкой молекулярной массой (или формальдегида) и низких концентрациях пероксида каталаза также обнаруживает пероксидазную активность. Оба фермента могут утилизировать как субстраты органические гидропероксиды с небольшими алифатическими заместителями, например гидропероксид этила и надуксусную кислоту. Ввиду того что в физиологических условиях могут существовать высокие концентрации других акцепторов и низкие концентрации пероксида, становится понятным, что в животных тканях каталаза действует почти исключительно как пероксидаза. В свою очередь это вызывает сомнения по поводу существования какой-либо другой независимой пероксидазы в животных тканях, кроме глутатионпероксидазы.

Пероксидаза из хрена (мол. масса 44 000), содержащая группу гема на молекул, реагирует с H_2O_2 с последовательным образованием соединений, которые можно обнаруживать спектрофотометрически (соединение I имеет максимум поглощения при 405 нм, а соединение II — при 425 нм). Предполагаемая реакция запишется следующим образом:



Соединение I представляет собой окисленную форму фермента, в которой железо связано с пероксидом и несколько электронов делокализованы, так что валентное состояние железа выше, чем Fe^{3+} . Затем соединение I превращается в соединение II и опять в исходный фермент в ходе последовательных одноэлектронных реакций, в которых субстрат сначала окисляется до свободного радикала, обнаруживаемого методом электронного парамагнитного резонанса, а затем полностью окисляется.

Литература

Книги

- Boyd G. S., Smellie R. M. S., eds., *Biological Hydroxylation Mechanisms*, Academic Press, Inc., New York, 1972.
 Boyer P. D., ed., *Oxidation-Reduction*, vol. XI—XIII of *The Enzymes*, 3d ed., Academic Press, Inc., New York, 1975, 1976.
 Chance B., Estabrook R. W., Yonetani T., eds., *Hemes and Hemoproteins*, Academic Press, Inc., New York, 1966.
 Hayaishi O., ed., *Molecular Mechanisms of Oxygen Activation*, Academic Press, Inc., New York, 1974.

- Keilin D.*, The History of Cell Respiration and Cytochromes. Cambridge University Press, New York, 1966.
- King T. E., Mason H. S., Morrison M.*, eds., Oxidases and Related Redox Systems, University Park Press, Baltimore, 1973.
- Lemberg R., Barret J.*, Cytochromes. Academic Press, Inc., New York, 1973.
- Lovenberg W.*, ed., Iron-Sulfur Proteins, Academic Press, Inc., New York, 3 vols., 1973, 1974, 1977.
- Singer T. P.*, ed., Flavins and Flavoproteins, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 1976.
- Smith K. M.*, Porphyrins and Mettaloporphyrins, Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1975.
- Sund H.*, ed., Pyridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases, Springer-Verlag, New York, Inc., New York, 1970.
- Thurman R. G., Yonetani T., Williamson R., Chance B.*, eds., Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems, Academic Press, Inc., New York, 1974.

Обзорные статьи

- Ambler R. P.*, Cytochromes *c*, Syst. Zool., **22**, 554—565, 1974.
- Bartsch R. G.*, Bacterial Cytochromes, Annu. Rev. Microbiol., **22**, 181—210, 1968.
- Beinert H.*, Iron-Sulfur Centers of the Mitochondrial Electron Transfer System, pp. 61—100, in: W. Lovenberg, ed., The Iron-Sulfur Proteins, vol. III, Academic Press, Inc., New York, 1977.
- Beinert H., Palmer G.*, Contributions of EPR Spectroscopy to Knowledge of Oxidative Enzymes, Adv. Enzymol., **27**, 105—198, 1965.
- Cardinale G. J., Udenfriend S.*, Prolyl Hydroxylase, Adv. Enzymol., **41**, 245—300, 1974.
- De Pierre J. W., Dallner G.*, Structural Aspects of the Membrane of the Endoplasmic Reticulum, Biochem. Biophys. Acta, **415**, 411—472, 1975.
- Diesseroth A., Dounce A. L.*, Catalase, Physiol. Rev., **50**, 319—375, 1970.
- Fridovich I.*, Superoxide Dismutases, Adv. Enzymol., **41**, 35—98, 1974.
- Fridovich I.*, Superoxide Dismutases, Annu. Rev. Biochem., **44**, 147—159, 1975.
- Gunsalus I. C., Pederson T. C., Sligar S. G.*, Oxygenase-catalysed Biological Hydroxylations, Annu. Rev. Biochem., **44**, 377—407, 1975.
- Hall D. O., Rao K. K., Cammack R.*, The Iron-Sulfur Proteins: Structure, Function and Evaluation of a Ubiquitous Group of Proteins, Sci. Prog., **62**, 285—316, 1975.
- Hamilton G. A.*, Mechanisms of 2- and 4-Electron Oxidations Catalyzed by Metalloenzymes, Adv. Enzymol., **32**, 55—96, 1969.
- Kamen M. D., Horio T.*, Bacterial Cytochromes, I: Structural Aspects, Annu. Rev. Biochem., **39**, 673—700, 1970; II: Functional Aspects, Annu. Rev. Microbiol., **24**, 399—428, 1970.
- Lemberg R.*, Cytochrome Oxidase, Physiol. Rev., **49**, 48—121, 1969.
- Malkin R., Malmström B. G.*, Copper in Biological Systems, Adv. Enzymol., **33**, 177—244, 1970.
- Margoliash E., Schejter A.*, Cytochrome *c*, Adv. Protein Chem., **21**, 113—286, 1966.
- Morris J. G.*, The Physiology of Obligate Anaerobiosis, Adv. Microb. Physiol., **12**, 169—246, 1975.
- Morrison M., Schonbaum G. R.*, Peroxide-catalyzed Halogenation, Annu. Rev. Biochem., **45**, 861—888, 1976.
- Ohnishi T.*, Mechanism of Electron Transport and Energy Conservation in Site I Region of the Respiratory Chain, Biochem. Biophys. Acta, **301**, 105—123, 1974.
- Ross E. M., Dockter M. E., Schatz G.*, Synthesis and Degradation of Mitochondrial Cytochromes, in: J. Cook, ed., Biogenesis and Turnover of Membrane Molecules, Raven Press, New York, 1977.
- Schatz G., Mason T. L.*, The Biosynthesis of Mitochondrial Proteins, Annu. Rev. Biochem., **43**, 51—87, 1974.

- Singer T. P., Kearney E. B., Kenney W. C.*, Succinate Dehydrogenase, *Adv. Enzymol.*, **37**, 189—272, 1973.
- Singer T. P., Kenney W. C.*, Biochemistry of Covalently-bound Flavins, *Vitam. Horm.*, **32**, 1—46, 1974.
- Suzuki I.*, Mechanisms of Inorganic Oxidation and Energy Coupling, *Annu. Rev. Microbiol.*, **28**, 85—101, 1974.
- Tsibris J. C. M., Woody R. W.*, Structural Studies of Iron-Sulfur Proteins, *Coord. Chem. Rev.*, **5**, 417—458, 1970.
- Winter H. C., Burris R. H.*, Nitrogenase, *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 409—426, 1976.
- Yagi K.*, Reaction Mechanism of D-Amino Acid Oxidase, *Adv. Enzymol.*, **34**, 41—78, 1971.
- Zumft W. G., Mortenson L. E.*, The Nitrogen-fixing Complex of Bacteria, *Biochem. Biophys. Acta*, **416**, 1—32, 1975.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие редактора перевода	5
Предисловие	7
Глава 1. Предмет биохимии	11

Часть первая

ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ КЛЕТКИ

Глава 2. Углеводы	24
2.1. Классификация	24
2.2. Моносахариды	25
2.2.1. Отнесение конфигурации	26
2.2.2. Циклические формулы альдоз и кетоз	28
2.2.3. Конформация	33
2.2.4. Биологически важные гексозы и пентозы	35
2.2.5. Производные моносахаридов	36
2.2.6. Некоторые реакции моносахаридов	41
2.3. Олигосахариды и полисахариды	45
2.3.1. Олигосахариды	45
2.3.2. Полисахариды	48
Литература	52
Глава 3. Липиды	54
3.1. Классификация	54
3.2. Жирные кислоты	55
3.2.1. Насыщенные жирные кислоты	55
3.2.2. Ненасыщенные жирные кислоты	57
3.2.3. Реакции жирных кислот	60
3.2.4. Характеристика смесей жирных кислот	61
3.3. Липиды, содержащие глицерин	62
3.3.1. Нейтральные жиры	62
3.3.2. Фосфоглицериды	67
3.4. Липиды, не содержащие глицерина	71
3.4.1. Сфинголипиды	71
3.4.2. Диольные липиды	75

3.4.3. Алифатические спирты и воска	76
3.4.4. Терпены	76
3.4.5. Стероиды	78
3.5. Липиды как амфифилы: мицеллы и омосомы	86
Литература	92
Глава 4. Белки. I	94
4.1. Основные структурные особенности	95
4.1.1. Ковалентная структура	95
4.1.2. Трехмерная структура	96
4.1.3. Биологическая активность и структура белка	99
4.1.4. Классификация белков	100
4.1.5. Некоторые основные принципы химии белка	101
4.2. Аминокислоты	101
4.2.1. Основные α-аминокислоты белков	101
4.2.2. Стереохимия аминокислот	109
4.2.3. Некоторые физико-химические принципы	110
4.2.4. Аминокислоты как электролиты	115
4.2.5. Химические свойства аминокислот	118
4.2.6. Номенклатура	120
4.2.7. Синтез пептидов	121
Глава 5. Белки. II	125
5.1. Определение молекулярной массы	125
5.1.1. Метод измерения скорости седиментации	126
5.1.2. Метод седиментационного равновесия	129
5.1.3. Седиментация в градиенте сахарозы	130
5.1.4. Осмотическое давление	131
5.1.5. Определение молекулярной массы белков на основании их состава	132
5.1.6. Фильтрация на молекулярных ситах	133
5.1.7. Гель-электрофорез и гель-фильтрация в присутствии додецилсульфата натрия	133
5.2. Форма белковых молекул	136
5.3. Амфотерные свойства	137
5.4. Растворимость	138
5.5. Очистка белков	140
5.6. Методы разделения и очистки биологически активных веществ	141
5.6.1. Принципы и классификация методов очистки	142
5.6.2. Противоточное распределение	144
5.6.3. Хроматография	147
5.6.4. Электрофорез	161
5.6.5. Критерии чистоты	163
Глава 6. Белки. III	166
6.1. Первичная структура	166
6.1.1. Аминокислотный состав	166
6.1.2. Субъединичная структура	170

6.2. Определение аминокислотной последовательности	177
6.2.1. Общий подход	177
6.2.2. Частичный гидролиз	179
6.2.3. Выделение пептидов	182
6.2.4. Анализ последовательности аминокислот в пептидах	182
6.2.5. Локализация дисульфидных мостиков	182
6.2.6. Аминокислотная последовательность ингибитора I свиного панкреотического трипсина	184
6.3. Конформация белков	185
6.3.1. Рентгеноструктурный анализ белков	185
6.4. Вторичная структура	187
6.4.1. Геометрия пептидной связи	187
6.4.2. α -Спираль	188
6.4.3. Складчатые листки	191
6.5. Третичная структура	194
6.6. Четвертичная структура	197
6.7. Белки-предшественники и ансамбли белков	200
6.8. Спектральные методы обнаружения конформационных переходов в белках	201
6.8.1. Спектры поглощения	201
6.8.2. Оптическое вращение белков	201
6.8.3. Дисперсия оптического вращения	202
6.8.4. Круговой дихроизм	203
6.9. Денатурация белков	203
Литература	205
Глава 7. Нуклеиновые кислоты	207
7.1. Компоненты нуклеиновых кислот	207
7.1.1. Пиримидины	207
7.1.2. Пурины	209
7.1.3. Углеводы	210
7.1.4. Нуклеозиды	210
7.1.5. Нуклеотиды	211
7.1.6. Методы исследования нуклеиновых кислот и их компонен- тов	213
7.2. Структура дезоксирибонуклеиновых кислот	214
7.2.1. Межнуклеотидные связи	214
7.2.2. Состав ДНК	216
7.2.3. Действие нуклеаз	217
7.2.4. Двухспиральная структура ДНК	218
7.2.5. Синтетические полинуклеотиды	221
7.2.6. Изменения в последовательности оснований. Мутации	222
7.2.7. Плотность ДНК	223
7.2.8. Денатурация ДНК	223
7.2.9. Ренатурация ДНК	226
7.2.10. Размер ДНК	227
7.2.11. Топология ДНК	229

7.2.12. Белки, связанные с ДНК	230
7.3. Структура рибонуклеиновых кислот	232
7.3.1. Межнуклеотидная связь	233
7.3.2. Транспортная РНК	233
7.3.3. Рибосомная РНК	236
7.3.4. Матричная РНК	236
Литература	236

Часть вторая

КАТАЛИЗ

Глава 8. Ферменты. I	238
8.1. Природа ферментов	239
8.1.1. Все ферменты — белки	240
8.1.2. Ферменты увеличивают скорость химической реакции, но не расходятся в результате процесса	240
8.1.3. Ферменты высокоспецифичны в отношении своих субстратов	240
8.1.4. В ходе ферментативного катализа происходит образование промежуточного соединения (комплекса) фермента с его субстратом (или субстратами)	241
8.1.5. Зона фермента, которая специфически взаимодействует с субстратом, называется активным центром	242
8.1.6. Ферменты понижают энергию активации химической реакции	243
8.1.7. Некоторые ферменты участвуют в регуляции скоростей реакций	244
8.2. Номенклатура и классификация ферментов	245
8.3. Кофакторы и коферменты	246
8.4. Кинетика ферментативных реакций	247
8.4.1. Уравнения скорости реакции	249
8.4.2. Природа K_m	252
8.4.3. Порядок реакции при ферментативном катализе	253
8.4.4. Кинетика двухсубстратных ферментативных реакций	254
8.4.5. Влияние температуры	256
8.4.6. Энергия активации	258
8.4.7. Влияние pH	259
8.5. Ингибирование ферментов	261
8.5.1. Конкурентное ингибирование	261
8.5.2. Неконкурентное ингибирование	264
8.5.3. Бесконкурентное ингибирование	265
8.6. Ингибиторы метаболизма: антиметаболиты	266
8.7. Регуляция ферментативной активности	268
8.7.1. Аллостерические ферменты	268
8.7.2. Активация ферментов в результате ковалентной модификации	277
Глава 9. Ферменты. II	281
9.1. Субстратная специфичность ферментов	281
9.2. Механизмы увеличения скоростей катализируемых ферментами реакций	285
9.2.1. Увеличение скорости и субстратная специфичность	285

9.2.2. Индуцированное соответствие и ферментативный катализ	288
9.2.3. Эффект приближения	289
9.2.4. Дестабилизация	290
9.2.5. Согласованный общий кислотно-основной катализ	292
9.2.6. Ковалентный катализ	294
9.3. Природа активных центров и механизм действия ферментов	297
9.3.1. Химотрипсин	298
9.3.2. Рибонуклеаза	306
9.3.3. Лизоцим	313
9.3.4. Карбоксипептидаза	317
9.4. Заключительные замечания	320
Литература	321

Часть третья

МЕТАБОЛИЗМ

Глава 10. Принципы биоэнергетики	323
10.1. Основные начала термодинамики	323
10.1.1. Химические равновесия	326
10.1.2. Преобразование энергии в живых системах	327
10.2. Окислительно-восстановительные реакции	330
10.2.1. Условия, облегчающие перенос электронов	331
10.2.2. Одноэлектронный перенос: свободные радикалы	332
10.2.3. Реакции окисления с участием молекулярного кислорода	333
10.2.4. Количественные аспекты окислительно-восстановительных реакций	337
10.2.5. Энергетические соотношения для окислительно-восстановительных реакций	343
10.3. Высокоэнергетические фосфаты	344
Литература	352
Глава 11. Общие аспекты метаболизма	354
11.1. Потребности в энергии	355
11.1.1. Калорийность питательных веществ	356
11.1.2. Основной метаболизм	378
11.1.3. Дыхательный коэффициент	359
11.1.4. Общие черты последовательных реакций метаболизма	360
11.2. Механизмы регуляции метаболизма	362
11.2.1. Регуляция клеточного метаболизма вискозными агентами	367
11.3. Основные черты структуры и функции клетки	368
11.3.1. Плазматическая мембрана	370
11.3.2. Основные черты явлений транспорта	374
11.3.3. Субклеточные органеллы и внутриклеточные мембраны	370
11.4. Экспериментальные подходы к изучению метаболизма	381
11.4.1. Уровни организации	381
11.4.2. Методы, используемые при изучении метаболизма	386
Литература	382

Глава 12. Биологическое окисление. I	394
12.1. Окислительные ферменты и коферменты	395
12.1.1. Коферменты дегидрогеназ	396
12.2. Цикл лимонной кислоты	398
12.2.1. Пируватдегидрогеназа и образование ацетильного производного кофермента А	398
12.2.2. Реакции цикла лимонной кислоты	404
12.2.3. Цикл лимонной кислоты: стерические аспекты	411
12.2.4. Регуляция цикла лимонной кислоты	413
12.3. Структура митохондрии	417
12.3.1. Перенос через внутреннюю митохондриальную мембрану	422
12.4. Перенос электронов	426
12.4.1. Электронпереносная цепь	429
12.5. Окислительное фосфорилирование	437
12.5.1. Выход энергии в цикле лимонной кислоты	438
12.5.2. Тканевое дыхание	439
12.5.3. Дыхательный контроль	441
12.5.4. Другие формы преобразования энергии в митохондриях	442
12.5.5. Механизм окислительного фосфорилирования	444
12.5.6. Митохондрии бурого жира	452
12.5.7. Эволюционное происхождение митохондрий	453
Литература	454
Глава 13. Биологическое окисление. II	455
13.1. Никотинамидениндинуклеотиды	457
13.1.1. Никотинамидинуклеотиддегидрогеназа	471
13.1.2. Другие функции NAD	471
13.2. Флавопротеиды	472
13.2.1. Железосероцентры	479
13.2.2. Флавопротеиды и железосероцентры	481
13.3. Цитохромы	487
13.4. Бактериальные цитохромы и перенос электронов	494
13.4.1. Флавоцитохромы	497
13.4.2. Форматдегидрогеназа	497
13.4.3. Сульфитоксидаза	497
13.5. Восстановительные системы	497
13.5.1. Рибонуклеотидредуктаза	498
13.5.2. Восстановление сульфата	499
13.5.3. Восстановление нитрата	501
13.6. Оксидазы, оксигеназы и гидроксилазы	503
13.6.1. Флавопротеидные оксидазы	503
13.6.2. Флавожелезопротеиды, содержащие молибден	503
13.6.3. Медьсодержащие оксидазы	505
13.6.4. Диоксигеназы	506
13.6.5. Моноксигеназы	508
13.6.6. Реакции введения одного атома кислорода, катализируемые цитохромом P ₄₅₀	512

13.6.7. Гем-оксигеназа	517
13.7. Другие переносчики электронов	518
13.7.1. Убихинон	518
13.7.2. Глутатин	518
13.7.3. Аскорбиновая кислота	518
13.7.4. Пероксид и супероксид	519
13.7.5. Супероксиддисмутазы	520
13.7.6. Каталаза и пероксидазы	521
Литература	523

СОДЕРЖАНИЕ тома 2

Часть третья.

МЕТАБОЛИЗМ (продолжение)

- Глава 14. Метаболизм углеводов. I
- Глава 15. Метаболизм углеводов. II
- Глава 16. Метаболизм углеводов. III
- Глава 17. Метаболизм липидов. I
- Глава 18. Метаболизм липидов. II
- Глава 19. Метаболизм липидов. III
- Глава 20. Метаболизм аминокислот. I. Растения и микроорганизмы
- Глава 21. Метаболизм аминокислот. II. Млекопитающие
- Глава 22. Метаболизм аминокислот. III
- Глава 23. Метаболизм аминокислот. IV
- Глава 24. Метаболизм пуринов и пиримидинов
- Глава 25. Генетические аспекты метаболизма. I
- Глава 26. Генетические аспекты метаболизма. II
- Глава 27. Генетические аспекты метаболизма. III
- Глава 28. Вирусы

СОДЕРЖАНИЕ тома 3

Часть четвертая

ЖИДКАЯ СРЕДА ОРГАНИЗМА И СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ ТКАНИ

- Глава 29. Кровь
- Глава 30. Иммунохимия и система комплемента
- Глава 31. Гемоглобин и химия дыхания
- Глава 32. Метаболизм эритроцитов и железа
- Глава 33. Регуляция электролитного, водного и кислотно-щелочного баланса
- Глава 34. Специализированные внеклеточные жидкости
- Глава 35. Функция почек и состав мочи
- Глава 36. Мышца
- Глава 37. Нервная ткань
- Глава 38. Соединительная ткань
- Глава 39. Кость. Метаболизм кальция и фосфата
- Глава 40. Глаз

Часть пятая

БИОХИМИЯ ЭНДОКРИННЫХ ЖЕЛЕЗ

- Глава 41. Общие сведения об эндокринных железах
- Глава 42. Щитовидная железа
- Глава 43. Паращитовидные железы
- Глава 44. Половые железы
- Глава 45. Надпочечники
- Глава 46. Поджелудочная железа
- Глава 47. Тимус
- Глава 48. Гипофиз

Часть шестая

ПИТАНИЕ

Глава 49. Основные питательные вещества

Глава 50. Водорастворимые витамины

Глава 51. Жирорастворимые витамины

Предметный указатель

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу: 129820, Москва, И-110, ГСП, 1-й Рижский пер., д. 2.

Абрахам Уайт, Филипп Хендлер, Эмиль Смит,
Р. Хилл, И. Леман

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

том 1

Научный редактор Т. И. Почкаева
Мл. научный редактор Н. Н. Устякова
Художник С. И. Мухин
Художественный редактор М. Н. Кузьмина
Технический редактор Е. С. Потапенкова
Корректор В. С. Соколов

ИБ № 2671

Сдано в набор 16.12.80. Подписано к печати 17.04.81.
Формат 60×90¹/₁₆. Бумага типографская № 1.
Тарнитура латинская. Печать высокая. Объем 16,75 бум. л.
Усл. печ. л. 33,50. Усл. кр. отт. 33,96. Уч.-изд. л. 35,14.
Изд. № 3/0812. Тираж 13.000 экз. Зак. 1148. Цена 3 р. 20 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома
при Государственном комитете СССР по делам издательств,
полиграфии и книжной торговли. Москва, 113105.
Нагатинская ул., д. 1.

НЕКОТОРЫЕ СОКРАЩЕННЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ СОЕДИНЕНИЙ И ЕДИНИЦ

Следующие сокращенные обозначения,
встречающиеся в современной биохимической литературе,
использованы в данной книге.

Перечень не является полным; в большинстве случаев, когда в тексте впервые вводится
сокращенное обозначение, оно приводится в скобках.

АПБ	ацилпереносающий белок	СМР	цитидинмонофосфат (цитидин-5'-фосфат)
АХ	ацетилхолин	CoASH или CoA	кофермент А
АХЭ	ацетилхолинэстераза	СТР	цитидинтрифосфат
Ацетил-СоА	ацетилкофермент А	Cys	цистеин (цистеннил)
Ацил-S-СоА	ацилкофермент А	dAMP	дезоксиаденозинмонофосфат
ДК	дыхательный коэффициент	dCMP	дезоксидитидинмонофосфат
ДНаза	дезоксирибонуклеаза	dGMP	дезоксигуаизинмонофосфат
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота	dIMP	дезоксиниозинмонофосфат
ДНФ	2,4-динитрофеиол	Dol	долихол
ДОФА	3,4-диоксифенилаланин	dTMP	тимидинмонофосфат
ДИФФ	диизопропилфторфосфат	dTTP	тимидинтрифосфат
ГАМК	γ-аминомасляная кислота	EDTA	этилендиаминтетрауксусная кислота
3-Р-Глицериновая кислота	3-фосфоглицериновая кислота	Е	фермент
Креатин-Р	креатинфосфат	FAD(FADH ₂)	флавинадениндинуклеотид (восстановленная форма)
ПАБК	п-аминобензойная кислота		
РНаза	рибонуклеаза		
РНК	рибонуклеиновая кислота		
иРНК (или мРНК)	информационная (или матричная) РНК	FDP	фруктозо-1,6-дифосфат
рРНК	рибосомная РНК	FMN(FMNH ₂)	флавиномононуклеотид, восстановленная форма (рибофлавинфосфат)
тРНК	транспортная РНК	F-1-P	фруктозо-1-фосфат
СЖК	свободная жирная кислота	F-6-P	фруктозо-6-фосфат
циклический АМР (или сАМР)	аденозин-3',5'-цикломонофосфат (3',5'-циклогуаниловая кислота)	Fru	остаток фруктозы
циклический GMP (или сGMP)	гуанозин-3',5'-цикломонофосфат (3',5'-циклоадениловая кислота)	FSH	фолликулостимулирующий гормон
		Fuc	остаток фукозы
А (или Ade)	аденин	G (или Gua)	гуанин
А (или Ado)	аденозин	G (или Guo)	гуанозин
Abe	остаток абеквоты	Gal	остаток галактозы
АСТН	адренотропный гормон	GalNAc	N-ацетилгалактозамин
ADP	аденозиндифосфат	GDP	гуанозиндифосфат
Ala	аланин (аланил)	GH	гормон роста (соматотропин)
AMP	аденозинмонофосфат (аденозин-5'-фосфат)	Glc	остаток глюкозы
Arg	аргинин (аргинил)	GlcA	глюконовая кислота
Asp	аспарагин (аспарагинил)	GlcN	глюкозамин
Asp	аспарагиновая кислота (аспартил)	GlcNAc	N-ацетилглюкозамин
АТР	аденозинтрифосфат	GlcUA	глюкуроновая кислота
АТР-аза	аденозинтрифосфатаза	Gln	глутамин (глутаминил)
С (или Cyt)	цитозин	Glu	глутаминовая кислота (глутамил)
С (или Cyt)	цитидин	Gly	глицин (глицил)
CDP	цитидиндифосфат	GMP	гуанозинмонофосфат (гуанозин-5'-фосфат)
Cer	церамид		

НЕКОТОРЫЕ СОКРАЩЕННЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ СОЕДИНЕНИЙ И ЕДИНИЦ (продолжение)

G-1-P	глюкозо-1-фосфат	NMN	никотинамидмононуклеотид
G-6-P	глюкозо-6-фосфат	P _i	неорганический фосфат
GSH	глутатион (восстановленный)	PEP	фосфоенолпируват
GSSG	глутатион (окисленный)	pGlu	пироглутамил
GTP	гуанозинтрифосфат	Phe	фенилаланин (фенилаланил)
Hb	гемоглобин	pI	изоэлектрическая точка
HbCO	СО-гемоглобин	PP _i	неорганический пирофосфат
HbO ₂	оксигемоглобин	Pro	пролин (пролил)
His	гистидин (гистидил)	PRPP	5-фосфорибозил-1-пирофосфат
HMC	5-оксиметилцитозин	Rha	остаток рамиозы
Hyl	оксилизин	S	константа Сведберга
Hyp	оксипролин (оксипролил)	Ser	серин (серил)
I	инозин (гипоксантирибонуклеозид)	T (или Thy)	тимин
ICSH (или LH)	гормон, стимулирующий интерстициальные клетки	T (или Thd)	тимидин
IdUA	идуоновая кислота	ThPP	тиаминпирофосфат
Ile	изолейцин (изолейцил)	Thr	треонин (тренил)
IMP	инозинмонофосфат	Trp	триптофан (триптофанил)
K _i	константа ингибирования	TSH	тиреотропин (тиреоидстимулирующий гормон)
K _m	константа Михаэлиса	Tyr	тирозин
Leu	лейцин (лейцил)	U (или Ura)	урацил
LH (или ICSH)	лютеинизирующий гормон	U (или Urd)	уридин
Lys	лизин (лизил)	UDP	уридиндифосфат
M	молекулярная масса	UDPглюкоза	уридиндифосфатглюкоза
Man	остаток маннозы	UMP	уридинмонофосфат (уридин-5'-фосфат)
Met	метионин (метионил)	Und	ундекапренол
MetHb	метгемоглобин	UTP	уридинтрифосфат
MSH	меланоцитстимулирующий гормон	V _{max}	максимальная скорость
NAD ⁺ (NADH)	никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма)	Val	валин (валил)
NADP ⁺ (NADPH)	никотинамидадениндинуклеотид-фосфат (восстановленная форма)	XMP	ксантиозинмонофосфат
NeuAc	N-ацетилнейраминавая кислота	Xyl	остаток ксилозы
NeuGlyc	N-гликозилнейраминавая кислота		

Некоторые другие обозначения приведены по мере необходимости в таблицах, например, обозначения нуклеозидов, найденных в транспортных РНК из различных источников, приведены в табл. 7.6, сокращения аминокислотных остатков — в табл. 4.1.